UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES
MÉCANISMES D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1971 - 1972 Série E. N° 239

THESE

présentée
à l'Unité d'Enseignement et de Recherches
des Mécanismes d'Action des Médicaments et des Toxiques
de l'Université René Descartes de Paris

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

par

Béatrice GAIRARD
née RAOUL

Titre de la thèse :

Recherches sur le rôle mitochondrial des iodothyronines en relation avec leur métabolisme

Soutenue le 25 octobre 1971

JURY : M. R. MICHEL Président
M. J. ROCHE
M. R. TRUCHOT Examinateurs
M. J. C. GOUNELLE

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES
MÉCANISMES D'ACTION DES MÉDICAMENTS ET DES TOXIQUES

Année 1971 - 1972 Série E. N° 239

THESE

présentée
à l'Unité d'Enseignement et de Recherches
des Mécanismes d'Action des Médicaments et des Toxiques
de l'Université René Descartes de Paris

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

par

Béatrice GAIRARD
née RAOUL

Titre de la thèse :

Recherches sur le rôle mitochondrial des iodothyronines en relation avec leur métabolisme

Soutenue le 25 octobre 1971

JURY :

M. R. MICHEL	Président
M. J. ROCHE	
M. R. TRUCHOT	Examinateurs
M. J. C. GOUNELLE	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Recherches sur le rôle mitochondrial des iodothyronines en relation avec leur métabolisme

RECHERCHES
SUR LE ROLE MITOCHONDRIAL DES IODOTHYRONINES
EN RELATION AVEC LEUR METABOLISME

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été réalisées au Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée du Collège de France sous la direction de M. le Recteur J.ROCHE. Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma reconnaissance pour l'accueil si bienveillant qu'il m'a réservé dans son Laboratoire et pour l'honneurqu'il m'a fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Qu'il me soit permis aussi de remercier M. le Professeur R.MICHEL qui m'a proposé ce sujet et m'a prodigué conseils et encouragements pendant sa réalisation.

Je suis reconnaissante à M. le Professeur R.TRUCHOT de l'Université de Dijon qui a bien voulu examiner mon travail et se déplacer pour faire partie de ce jury.

Je remercie M. le Professeur J.C.GOUNELLE qui a bien voulu analyser mon travail et faire partie de ce jury.

Ma gratitude s' adresse aussi à Madame Odette MICHEL qui,tout au long de ces années,m'a si souvent encouragée.Qu'Elle reçoive ici l'expression de mon amicale reconnaissance.Je tiens à remercier mes collègues et camarades du Collège de France qui m'ont facilité ma tâche et plus particulièrement Madame Eléonore MARQUE dont l'efficacité et la compétence liées à son amitié m'ont beaucoup aidée,M. TINE qui m'a donné la possibilité d'utiliser le spectrophotomètre Cary du C.R.S.S.A.,Mademoiselle Maguy LUCAS dont l'amitié m'a été précieuse.
Je n'oublie pas tous ceux du Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Paris qui ont collaboré avec beaucoup de gentillesse à l'élaboration de mon travail.

INTRODUCTION ET OBJET DU TRAVAIL

Les mitochondries sont des structures subcellulaires où l'énergie produite par la respiration est mise en réserve sous forme d'ATP (1,2,3,4). Plusieurs compartiments (5) sont délimités correspondant à des fonctions différentes (6,7)

- Le compartiment extérieur ou espace intermembranaire compris entre la membrane externe et la membrane interne.

- Le compartiment intérieur qui comprend la matrice.

Ces deux compartiments sont structuralement isolés : à cette ultrastructure sont liés des problèmes de barrière de perméabilité. Les structures membranaires ainsi définies constituent les supports des activités enzymatiques nécessaires à l'organisation fonctionnelle des mitochondries. La compartimentation des enzymes et des substrats (8) est l'une des caractéristiques de celles-ci.

La membrane externe laisse passer les substances de faible poids moléculaire telles que sels minéraux, saccharose, nucléotides délimitant ainsi un espace perméable non spécifique (9,10). La membrane interne est douée de perméabilité sélective puisqu'elle est peu perméable aux ions K^+ et H^+ alors qu'elle permet pourtant le passage de certains ions de diamètre supérieur comme l'acétate ou le phosphate (11,12).

Sur les crêtes mitochondriales constituées par les invaginations de la membrane interne se trouve un complexe enzymatique

constituant la chaîne respiratoire qui catalyse la déshydrogénation de substrats et le transfert d'électrons vers l'oxygène avec mise en réserve d'énergie sous forme d'ATP par phosphorylation de l'ADP. Le transfert des électrons se fait par ordre croissant des potentiels redox des différents coenzymes depuis le substrat jusqu'à l'oxygène dont le potentiel redox à pH 7,0 est

$$E'_o = + 0{,}80 \text{ volts} \qquad O + 2e \rightleftharpoons O^{--}$$

Le schéma 1 représente la chaîne des transporteurs d'électrons dans l'ordre dans lequel ils se succèdent.

Récemment, on a mis en évidence deux cytochromes b différents (13,14,15,16,17,72) : un cytochrome b_1 de potentiel invariable voisin de +20mv et un cytochrome b_T de potentiel variable qui s'élève de -35mv s'il n'y a pas de phosphorylation jusqu'à +240mv s'il y a mise en réserve d'énergie.

Un composé important dont la localisation n'est pas encore exactement établie avec certitude est l'ubiquinone. Celle-ci a été séparée de fractions lipidiques de foie de rat par MORTON et coll. (18,19,20,23) puis retrouvée dans le rein de plusieurs espèces animales (21) et chez l'homme (22,23). Cette substance semble jouer un rôle biologique important car HEMMING l'a caractérisé dans les mitochondries de foie et de rein (24). Simultanément CRANE (25) entreprenait des recherches pour l'isoler à partir de fractions lipidiques jouant le rôle de transporteur d'électrons dans les processus d'oxydation. Il sépara par chromatographie des extraits lipidiques mitochondriaux cardiaques de boeuf un composé cristallin jaune présentant un maximum d'absorption à 275nm et fondant à 48°C et dont le spectre infrarouge a permis son identification comme étant de l'ubiquinone désignée aussi sous le nom de coenzyme Q. Par la suite, les recherches ont montré qu'il n'existait pas qu'une seule ubiquinone mais plusieurs composés à squelette benzoparaquinonique variant entre

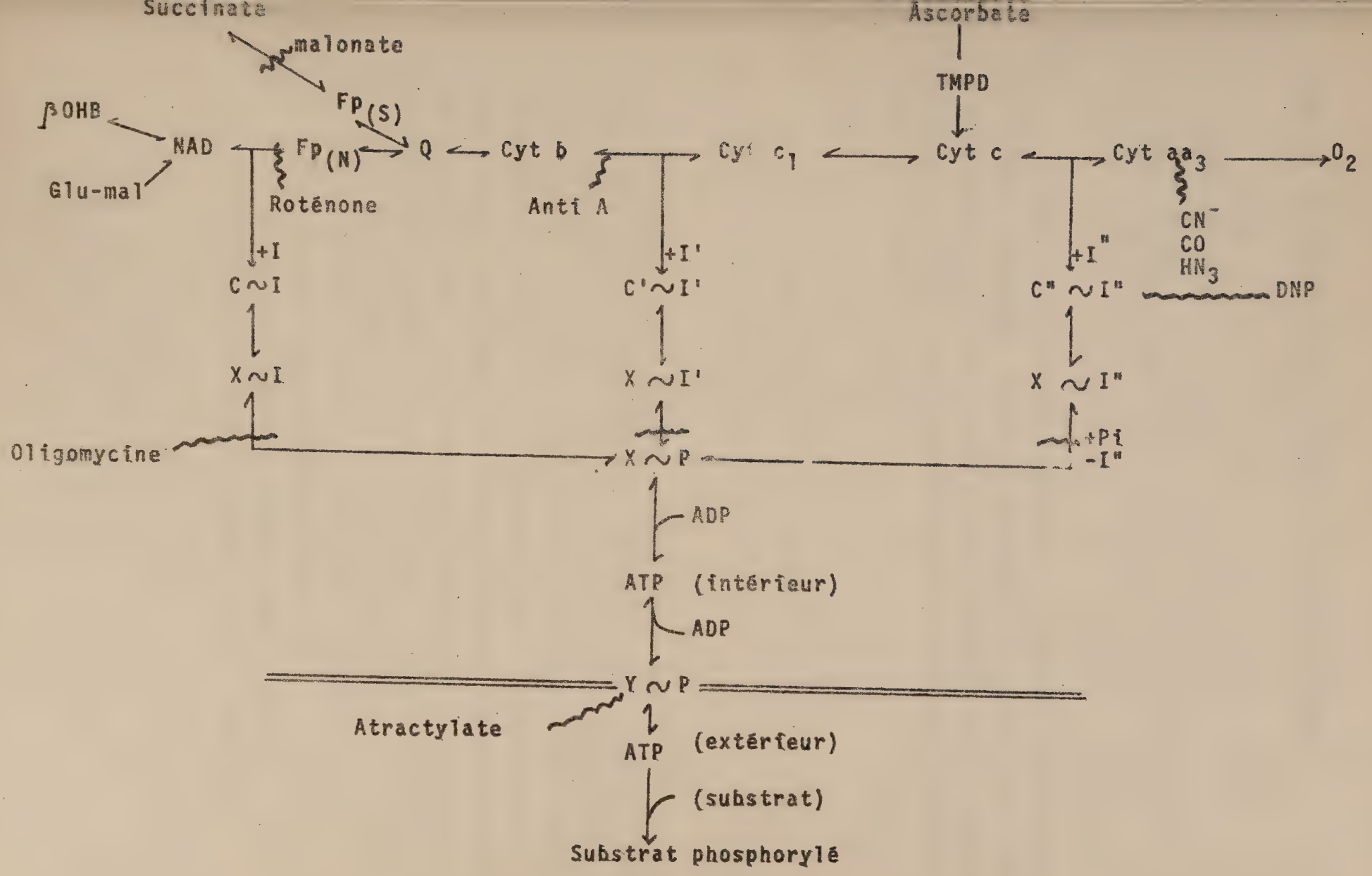
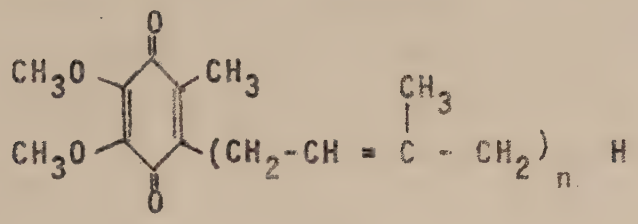


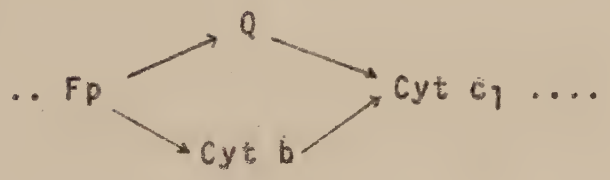
Figure 1 - Schéma de la chaîne respiratoire

~~~ Inhibiteurs
~~~

eux par la nature d'une longue chaîne isoprénoïde :



La position de l'ubiquinone dans la chaîne respiratoire n'est pas totalement connue, l'hypothèse la plus valable consiste à considérer qu'elle se situe en série juste avant le cytochrome b (26,27,28,29) mais certaines molécules pourraient peut-être fonctionner en parallèle (30)



Le métabolisme oxydatif des substrats par la mitochondrie libère une énergie considérable. Celle-ci peut être dissipée sous forme de chaleur ou bien utilisée par des réactions endergoniques comme la mise en réserve sous forme d'ATP. Grâce aux mesures calorimétriques (31,32), on a pu constater que les quantités de chaleur dégagées par l'oxydation du NADH et du succinate supposaient une mise en réserve de l'énergie. A partir de là on a pu évaluer le nombre de liaisons riches en énergie susceptibles de se former au cours de la respiration à partir d'un substrat, correspondant aux trois sites de phosphorylation caractérisés :

- site I dans le segment NAD - F_p
- site II dans le segment Cyt b - Cyt c_1
- site III dans le segment Cyt c - Cyt aa_3

Ainsi quand on part d'un substrat oxydable par la voie du NAD, trois liaisons Phosphate P ~ sont synthétisées alors que deux seulement lorsqu'on part du succinate et une seule à partir de l'ascorbate-tétra-méthyl-phénylène-diamine (TMPD). Le fonctionnement de la chaîne respiratoire dépend non seulement de la présence des substrats, de la quantité d'oxygène mais aussi du rapport ADP/ATP. En effet, si la quantité d'ATP augmente et si on se place en anaérobiose, la chaîne peut fonctionner en sens inverse (33,2,34).

La constitution de la chaîne respiratoire a été déterminée grâce aux considérations physicochimiques que nous venons de voir mais aussi et surtout par l'utilisation d'effecteurs du transfert des électrons ou des étapes qui conduisent à la mise en réserve de l'énergie.

En effet, on constate que des mitochondries mises en présence de β hydroxybutyrate comme substrat respirent mais l'addition de roténone provoque l'arrêt de la respiration qui peut repartir après addition de succinate. Cette expérience met ainsi en évidence l'action de la roténone entre le NAD et le carrefour des déshydrogénases (35,36). Par contre, l'addition de malonate empêche la respiration des mitochondries mises en présence de succinate, la consommation d'oxygène est rétablie quand on ajoute du β hydroxybutyrate. La respiration mitochondriale arrêtée par addition d'Antimycine A peut être restaurée par adjonction d'Ascorbate-TMPD. Par contre, toute respiration à partir de n'importe lequel de ces substrats est inhibée par le cyanure ce qui situe son action au niveau terminal de la chaîne.

La biosynthèse de l'ATP est affectée par les inhibiteurs respiratoires qui se comportent comme effecteurs indirects et surtout par d'autres composés qui interfèrent directement avec la mise en réserve de l'énergie.

Ainsi l'addition de 2,4-dinitrophénol accélère considérablement la respiration mitochondriale sans ADP et la modifie peu en présence d'ADP mais dans ce cas sans formation d'ATP. Par contre, en présence d'oligomycine, il n'y a pas de changement de vitesse respiratoire en présence d'un substrat seul, avec l'ADP

la consommation d'oxygène est fortement ralentie sans production d'ATP. L'addition de dinitrophénol après oligomycine lève l'inhibition respiratoire avec suppression de formation d'ATP ce qui fait dire que le dérivé nitré agit à une étape située avant celle de l'oligomycine. Ces faits ont permis de mettre en évidence deux types de réaction, l'une avant l'intervention de Phosphate appelée étape de conservation de l'énergie ou couplage, et l'autre après l'organification du Phosphate ou étape de tranfert de l'énergie.

Ces définitions proviennent de la théorie chimique (2,37,38) que l'on peut qualifier de classique qui suppose l'existence de deux intermédiaires chimiques énergétiques non isolés. Le schéma suivant résume cette hypothèse :

(1) C_1 red + C_2 ox + I $\leftrightharpoons$ C_1 ox + C_2 red $\sim$ I

(2) C_2 red $\sim$ I + X $\leftrightharpoons$ C_2 red + X $\sim$ I

(3) X $\sim$ I + Pi $\leftrightharpoons$ X $\sim$ P + I

(4) X $\sim$ P + ADP $\leftrightharpoons$ ATP + X

C_1 et C_2 sont des transporteurs voisins d'électrons. P_i est de l'orthophosphate. X et I sont des intermédiaires chimiques inconnus. Les réactions (1) et (2) constituent les étapes de conservation de l'énergie ou de couplage, les réactions(3) et (4) correspondent à celles de transfert de l'énergie. A chaque site de phosphorylation sont localisés des facteurs de couplage.

Une autre théorie fait appel à des considérations physico-chimiques, c'est la théorie chemiosmotique émise par MITCHELL (39,40,41,42,43,44) basée sur le fait que la membrane interne est imperméable aux protons. MITCHELL suggère que le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire engendre un gradient d'ions H^+. Ce gradient constituerait la force motrice nécessaire à la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et phosphate

$$ADP + Pi + H^+ \leftrightharpoons ATP + HOH$$

La mise en réserve d'énergie peut se réaliser très rapidement si l'équilibre de la réaction se déplace de gauche à droite grâce à une ATPase laquelle serait peut-être l'un des facteurs de couplage.

Les mécanismes d'action par lesquels les découplants oxydent les substrats avec perte d'énergie s'interprètent différemment selon la théorie adoptée pour expliquer la biosynthèse de l'ATP à partir de l'énergie respiratoire.

La théorie chimique (2,45,46,47) suppose que les découplants provoquent l'hydrolyse d'un intermédiaire à haute énergie au fur et à mesure de sa formation, il s'ensuit une dissipation de l'énergie et une libération du composé C qui va pouvoir réagir rapidement avec le transporteur suivant ce qui provoque une augmentation considérable de la consommation d'oxygène par les mitochondries en absence d'accepteur de phosphate.

$$C_2 \text{ red} \sim I + H_2O \xrightarrow{\text{dinitrophénol}} C_2 \text{ red} + I$$

L'activité ATPasique induite par le dinitrophénol (48) proviendrait selon la voie inverse des équations permettant le transfert de l'énergie et sa conservation.

Selon la théorie de MITCHELL (49), les découplants rendraient les membranes perméables aux protons détruisant ainsi le gradient $H^+ - OH^-$ et donc la force motrice nécessaire à la synthèse de l'ATP (50).

D'autres substances agissent sur le fonctionnement mitochondrial (50,51,52): les cations divalents dont les plus étudiés sont le calcium et le strontium activent considérablement la respiration (53,54,55). En présence d'anion perméant comme le phosphate, cette stimulation respiratoire s'accompagne de formation de phosphate de calcium (56,57) et le cation est activement accumulé (58,59,60,61). En absence de phosphate il y a éjection de protons (62,63,64) et alcalinisation de la mitochondrie (65, 66,67,68,69,70,71). Comme cette accumulation est inhibée par le 2,4-dinitrophénol on est amené à penser que les cations agissent sur un intermédiaire à haute énergie $X \sim I$ (54) juste après le site d'action du dinitrophénol.

Ces deux cations ont cependant un comportement différent sur la fixation active de l'eau par les mitochondries. Alors que le calcium provoque le gonflement mitochondrial (73) le strontium est sans effet et s'oppose même à l'hypertrophie provoquée par le calcium ou la thyroxine (74). La fixation active de l'eau par les mitochondries après addition d'iodothyronine n'a plus lieu lorsque le milieu renferme des inhibiteurs respiratoire ou des agents découplants (75), or les phénols iodés interfèrent sur les oxydophosphorylations, la thyroxine in vitro semble agir préférentiellement sur les mitochondries intactes plutôt que sur les subparticules (76,77). L'action respiratoire est relativement complexe (78) puisqu'elle freine la consommation d'oxygène de mitochondries placées en présence d'ADP alors qu'elle l'active en absence d'accepteur de phosphate. Des similitudes d'action avaient rapproché les phénols nitrés des phénols iodés à qui on avait attribué des propriétés découplantes (78) d'autant plus qu'ils renforcent la réponse calorigénique de ceux-ci (79). L'effet découplant (80) des produits thyroïdiens a été confirmé par une analogie d'action à faible concentration, de plus ils stimulent la respiration en absence d'ADP et lèvent l'inhibition dûe à l'oligomycine, inhibiteur de phosphorylation, en présence d'ADP (81). En suivant les variations de pH (82,83,84) qui rendent compte de la biosynthèse de l'ATP puisqu'elle s'accompagne de captation de protons, on a pu montrer que l'acide triiodothyroacétique inhibait la phosphorylation à des doses où l'inhibition respiratoire n'était plus visible. Ces résultats ont permis de dissocier l'effet respiratoire de l'effet découplant.

Cependant, des faits différencient les phénols iodés des phénols nitrés : le dinitrophénol stimule toujours la respiration sauf à fortes doses, et ceci quel que soit l'état thermodynamique (85). Si le DNP active l'ATPase les composés iodés par contre l'inhibent (86,80).

D'autres travaux ont pu mettre en évidence l'action des iodothyronines sur la biosynthèse de l'ATP en les associant à des effecteurs des étapes de mise en réserve de l'énergie (87). L'inhibition respiratoire provoquée par les phénols halogénés quand les mitochondries se trouvent en présence d'ADP est en partie levée par l'ATP endogène ce qui semble montrer que l'activité ATPasique reste faible. Les composés thyroïdiens affectent différemment la respiration mitochondriale selon la teneur en orthophosphate mais leur action n'est pas modifiée par l'absence de Mg^{++} cofacteur de la réaction d'échange ADP-ATP. Ces faits (87) permettent d'exclure que l'intervention hormonale sur les étapes de synthèse de l'ATP se situe au niveau des réactions de transfert de l'énergie.

L'utilisation du 2,4-dinitrophénol (88) et des cations divalents (54,51) ont apporté de nouveaux éléments du problème. On a montré que les effets du 2,4-dinitrophénol et de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique s'ajoutent mais l'activité respiratoire du premier atteint une limite en présence des phénols iodés Par ailleurs, les iodothyronines inhibent la respiration mitochondriale activée par le Strontium (89) en s'opposant à sa fixation active, cette réponse pourrait être dûe à une compétition entre le cation et les produits thyroïdiens dans la formation d'un complexe avec X ∼ I plus stable avec ces derniers.

Des recherches plus poussées ont conduit plusieurs auteurs à déterminer le site d'action et le mécanisme de l'effet de ces substances sur la respiration. Alors que le DNP s'oppose de façon compétitive à la pénétration du substrat dans la mitochondrie (90), les produits thyroïdiens affectent l'oxydation du succinate de façon non compétitive (91). Au niveau des chaînes respiratoires, les hormones thyroïdiennes n'exercent leur action que si le transfert est assuré au niveau du deuxième site de phosphorylation (92). Par ailleurs, les analyses spectrophoto-

métriques ont montré que l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique réduit les flavoprotéines et oxyde les cytochromes b, c et c_1 (93). De plus l'inhibition respiratoire qui se manifeste en présence d'ADP à partir du succinate et du β hydroxybutyrate n'a plus lieu à partir de l'ascorbate-TMPD. En outre, la thyroxine s'oppose à la réduction des pyridine-nucléotides en présence de succinate (94). Ces résultats permettent de considérer l'existence d'un "cross over point" au carrefour des déshydrogénases peut-être au niveau de l'ubiquinone. Les recherches réalisées in vivo (95,96) confirment l'influence des hormones thyroïdiennes sur la respiration et la phosphorylation (96) et leur point d'impact dans la zone comprise entre le cytochrome b et le NAD (95).

On peut se demander si ces effets qui traduisent des changements dans les mécanismes des oxydophosphorylations sont dûs aux iodothyronines elles-mêmes ou à un de leurs dérivés. Il est bien établi qu'après administration à l'animal, les hormones iodées exigent un temps de latence pour agir. Ce délai peut s'expliquer de deux façons: d'une part, par le temps de passage exigé pour atteindre le milieu intracellulaire puisque la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine agit plus rapidement et plus intensément que la L-thyroxine (T_4) fait en accord avec une vitesse de pénétration plus rapide(128), d'autre part, les réponses hormonales pourraient correspondre à la formation d'un métabolite actif(129). On avait émis l'hypothèse que celui-ci pouvait être l'acide 3,5,3'-triiodo thyroacétique(127). Bien que de nombreux enzymes pouvant dégrader T_4 aient été caractérisés dans les mitochondries (130) aucun changement décelable de l'hormone n'avait été mis en évidence lors de son effet sur la morphologie des particules isolées. Dans ce but, nous avons étudié le métabolisme de la L-thyroxine et de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine en relation avec leur influence sur les mécanismes d'oxydophosphorylation. Au préalable, nos recherches ont porté sur la vitesse de pénétration mitochondriale de ces produits.

On peut envisager qu'aux changements respiratoires provoqués par les iodothyronines correspondent des modifications de l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons. On est d'autant plus fondé à le supposer que l'existence d'un "cross over point" au carrefour des déshydrogénases au niveau de l'ubiquinone a été caractérisé avec l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (93). Cependant, jusqu'ici, il n'existe aucune donnée sur les hormones elles-mêmes. Nous avons repris ces recherches afin d'essayer de déterminer si ce fait pouvait être étendu à la L-thyroxine et la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine .

Nous avons , par ailleurs, tenté d'explorer le comportement de l'ubiquinone qui, par sa localisation dans les chaînes respiratoires, pouvait être impliquée dans l'effet mitochondrial des iodothyronines.

Notre travail comportera quatre chapitres :

- le premier est consacré à la description des techniques générales et de l'appareillage utilisés,

- le deuxième a pour objet l'étude de la pénétration et le métabolisme des hormones thyroïdiennes lors de leur action sur les mitochondries isolées,

- le troisième relate les effets de divers effecteurs sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires,

- le quatrième, enfin, se rapporte à la détermination de l'état redox de l'ubiquinone et du NAD dans différentes conditions sous l'effet de la L-thyroxine.

C H A P I T R E I

MATERIEL ET TECHNIQUES GENERALES

L'ensemble du travail est réalisé sur des mitochondries hépatiques ou cardiaques de rat. La préparation des particules et les contrôles des qualités sont effectués par des méthodes biochimiques courantes : ultracentrifugation, polarographie, spectrophotométrie.

Nous envisagerons dans ce chapitre les conditions expérimentales communes à tous les essais en détaillant les modifications apportées à ces techniques habituelles ou plus récentes telles que la spectrophotométrie différentielle à double longueur d'onde.

I- Préparation des mitochondries

1) Mitochondries hépatiques de rat

Les expériences que nous avons réalisées nécessitent l'obtention de particules non lésées, ayant conservé leur structure intacte et aussi pure que possible. Leur qualité se traduit par un indice de contrôle respiratoire élevé.

La méthode utilisée est celle de SCHNEIDER et HOGEBOOM (100) modifiée (101). Trois rats Wistar albinos mâles sont sacrifiés par section des carotides et rapidement saignés. Les foies sont vite prélevés et plongés dans du saccharose 0,25 M à 0°C. Toutes les opérations sont exécutées dans des récipients maintenus à 0°C dans un bain de glace.

a) Homogénéisation

On dilacère le tissu hépatique à l'aide de ciseaux jusqu'à obtention de petits morceaux. On lave soigneusement 5 ou 6 fois avec la solution de saccharose 0,25 M pour permettre l'élimination du sang, de l'hémoglobine libérée par hémolyse et du tissu conjonctif qui pouvait adhérer au foie. L'homogénéisation réalisée ensuite par petites fractions à l'aide d'un Potter en téflon tournant à 850 tours/minute doit être conduite aussi rapidement que possible afin de laisser les structures particulaires intactes.

b) Séparation et lavages

L'homogénat est soumis à une première centrifugation à 0°C pendant 10 minutes à 650g (centrifugeuse Servall RC 2 B Rotor GSA 5,75 pouces 2000 tours/minute). Le culot constitué essentiellement de cellules intactes, membranes cellulaires, noyaux, hématies,est éliminé. Le surnageant contenant les mitochondries est alors centrifugé 10 minutes à 12.000g (centrifugeuse Servall RC 2 B Rotor SS 34 10.000 tours/minute). Le surnageant est rejeté par décantation et les lipides adhérant à la paroi du tube à centrifuger sont enlevés en essuyant soigneusement celui-ci avec du papier filtre. Le culot remis en suspension dans le volume initial de saccharose est recentrifugé 10 minutes à 12.000g et le lavage est répété une deuxième fois. Le culot de mitochondries est remis en suspension dans 3ml environ de saccharose 0,25 M et homogénéisé à la main à l'aide du Potter.

La préparation ainsi obtenue doit être utilisée dans les 2 heures qui suivent en la conservant dans de la glace pilée. Au-delà de ce délai le couplage des mitochondries diminue et des propriétés ATPasiques apparaissent.

Ce mode opératoire permet d'éviter le gonflement des mitochondries et ne nécessite pas la présence d'EDTA qui aurait été gênant dans les expériences utilisant les cations alcalino-terreux.

2) Mitochondries cardiaques de rat (29,102)

Elles sont préparées selon le même principe et en prenant encore plus de précautions afin de ne jamais dépasser +1°C. Deux rats mâles de 150g environ sont sacrifiés par section carotidienne. Les coeurs prélevés le plus rapidement possible sont découpés sur du papier filtre pour éliminer le sang. Les fragments cardiaques correspondant à deux coeurs sont mis en suspension dans 5ml d'un milieu d'isolement constitué de saccharose 0,3 M chlorhydrate de triéthanolamine 20 mM à pH 7,2. Après addition de 1 mg de protéinase bactérienne cristallisée "Novo", on homogénéise une première fois avec un Potter accompagné d'un piston en téflon de petite capacité. Après 10 minutes d'incubation à 0°C on répète l'homogénéisation par quatre ou cinq aller et retour du piston. L'homogénat dilué avec 40 ml de milieu d'isolement est centrifugé 10 minutes à 300g (centrifugeuse Servall RC 2 B Rotor SS 34 5,25 pouces 1.600 tours/minute). Après élimination du culot, le surnageant est centrifugé à 5.000g pendant 10 minutes (centrifugeuse Servall RC 2 B Rotor SS 34 7.500 tours/minute). Le culot de mitochondries est ensuite lavé par mise en suspension dans le milieu d'isolement et recentrifugé 10 minutes à 5.000g. Enfin, on reprend le culot par 1 ml de milieu (pour deux coeurs), il renferme alors environ 20mg de protéines par ml.

Ce procédé est réalisé, contrairement à la méthode originale, sans EDTA ni sérumalbumine. Les mitochondries cardiaques ainsi préparées doivent être utilisées très rapidement car le contrôle respiratoire commence à baisser après une heure et une activité ATPasique se manifeste alors.

II- Caractérisation biochimique des mitochondries

1) Dosage des protéines mitochondriales

Afin que les expériences soient comparables, il est préférable d'opérer avec des quantités voisines de mitochondries, il est dès lors nécessaire de connaître la teneur en protéines des suspensions mitochondriales.

Il a donc fallu choisir une méthode suffisamment rapide et ne nécessitant pas une prise d'essai trop importante. Nous avons été amené à utiliser la réaction du biuret dans ces conditions.

a) Principe

Après avoir lysé les membranes mitochondriales par du cholate de sodium, on détermine la teneur en protéines par la réaction du biuret en se rapportant à une gamme étalon de sérum albumine bovine.

b) Réactifs

Sérum albumine bovine à	5mg/ml
Cholate de sodium à	4 p.cent
NaOH	10 p.cent
$CuSO_4$	1 p.cent

c) Mode opératoire

Une prise d'essai de la suspension mitochondriale de volume inférieur à 0,1 ml est additionnée de 0,2 ml de la solution de cholate de sodium, après agitation on complète à 2,7 ml par la solution de soude. On ajoute ensuite 0,3 ml de la solution de sulfate de cuivre. On attend alors 15 minutes que la coloration se stabilise et on lit l'absorption à 540 nm sur un spectrophoto-

mètre à double faisceau Beckmann DB. Le zéro est effectué sur les réactifs seuls. On se reporte à la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions.

Les prises d'essai doivent contenir une quantité de protéines inférieure à 3mg, car la courbe d'étalonnage n'est plus linéaire pour les concentrations plus importantes.

Nous choisissons, en général, de mettre dans le milieu réactionnel une concentration mitochondriale déterminée en faisant varier le volume de la prise d'essai.

2) Détermination de la consommation d'oxygène

Au cours de notre travail, nous suivons la vitesse respiratoire des mitochondries ce qui nous permet de connaître leur état au moment des prélèvements lors des études de métabolisme ou bien lorsque les essais sont effectués en parallèle avec les mesures de l'état redox des coenzymes.

a) Appareillage

Pour les recherches sur les propriétés oxydophosphorylantes des mitochondries en relation avec le métabolisme des iodothyronines, nous avons utilisé un oxygraphe GILSON GME à électrode vibrante de platine recouverte de polyéthylène. Le potentiel de polarisation à travers l'électrode de mesure polarisable est de -0,65 volts par rapport à l'électrode de référence impolarisable au calomel. Les deux électrodes sont reliées par un pont de KCl. Cet appareillage a l'avantage de comporter une cellule réactionnelle de petit volume : 2,5 ml et d'utiliser ainsi moins de mitochondries.

Pour les essais réalisés simultanément aux enregistrements au spectrophotomètre à double longueur d'onde, nous avons préféré utiliser un oxygraphe GILSON GME (modèle K) avec électrode de CLARK (103). La suspension mitochondriale est placée dans une cellule thermostatée à 25°C d'un volume de 3 ml égal à celui de

la cuve du spectrophotomètre. L'homogénéisation du milieu est assurée par la rotation d'un petit disque d'acier recouvert de téflon entraîné par un agitateur magnétique. L'électrode de CLARK est constituée d'une cathode de platine en contact avec une anode de référence Ag-AgCl par l'intermédiaire d'une solution de KCl à demi saturation. L'extrémité de cette électrode est recouverte d'une fine membrane de polyéthylène qui laisse diffuser l'oxygène mais empêche les protéines de se fixer sur la cathode. La tension de polarisation constante et stable appliquée est de -0,80 volts par rapport à l'anode de référence.

b) Mesure de la consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène est mesurée par la méthode polarographique qui possède l'avantage de montrer l'évolution des phénomènes en continu et qui permet de déceler des variations extrêmement brèves de la consommation d'oxygène.

Le courant est dû à l'électrolyse de l'eau au niveau de l'électrode de platine et ce phénomène augmente avec la quantité d'oxygène. On suit donc l'intensité du courant dont les variations sont proportionnelles à la concentration d'oxygène dissous dans le milieu.

La sensibilité des deux types d'électrode est sensiblement la même mais l'électrode de CLARK permet d'utiliser des concentrations en protéines plus élevées.

3) Détermination du contrôle respiratoire et du rapport P/O(104)

Les qualités biochimiques des mitochondries se manifestent par une stimulation de leur vitesse respiratoire en présence d'ADP et par leur capacité de phosphorylation (105). L'index de contrôle respiratoire et le P/O sont calculés à chaque manipulation et servent à vérifier la qualité des préparations.

a) Index de contrôle respiratoire

L'index de contrôle respiratoire ou "RC" a été défini par CHANCE (106) comme étant le rapport de la vitesse respiratoire des mitochondries placées dans l'état actif, c'est-à-dire en présence d'accepteur de phosphate, sur celle de l'état contrôlé, c'est-à-dire en absence d'ADP, après sa consommation.

b) Rapport P/O

La consommation d'oxygène par des mitochondries en suspension dans un tampon isotonique est faible si seul un substrat est présent sans ADP. L'addition d'ADP provoque une augmentation immédiate de la consommation d'oxygène et la durée de celle-ci dépend de la quantité d'ADP ajouté au milieu. Comme l'ont montré CHANCE et WILLIAMS (107) et HAGIHARA (108), la quantité d'oxygène utilisée est proportionnelle à la quantité d'ADP qui s'est phosphorylée en ATP. On peut donc déterminer le rapport ADP/O ou P/O d'après les tracés oxygraphiques illustrés dans la figure 2

Selon le substrat on peut trouver par le calcul la P/O théorique : avec les substrats qui réduisent le NAD il y a synthèse de trois molécules d'ATP chaque fois que deux électrons sont transportés jusqu'à l'oxygène (109), le rapport P/O est alors égal à 3. Si le substrat est le succinate il n'y a plus que deux phosphorylations et le P/O = 2. Ces valeurs sont confirmées par les études thermodynamiques.

La figure 2 donnée à titre d'exemple, illustre les expériences réalisées à l'oxygraphe avec électrode de CLARK : 0,2 ml de suspension mitochondriale contenant 7,2mg de protéines sont ajoutées à 3 ml de tampon isotonique de CHANCE. Le succinate de sodium 6 mM est utilisé comme substrat et le milieu contient de la roténone 1,5 µM pour bloquer la voie NADH-déshydrogénase. La température est maintenue à 25°C. Les enregistrements traduisent les variations de la consommation d'oxygène en pourcentage de la saturation en fonction du temps exprimé en minutes. Les pentes sont proportionnelles aux vitesses respiratoires. Le rap-

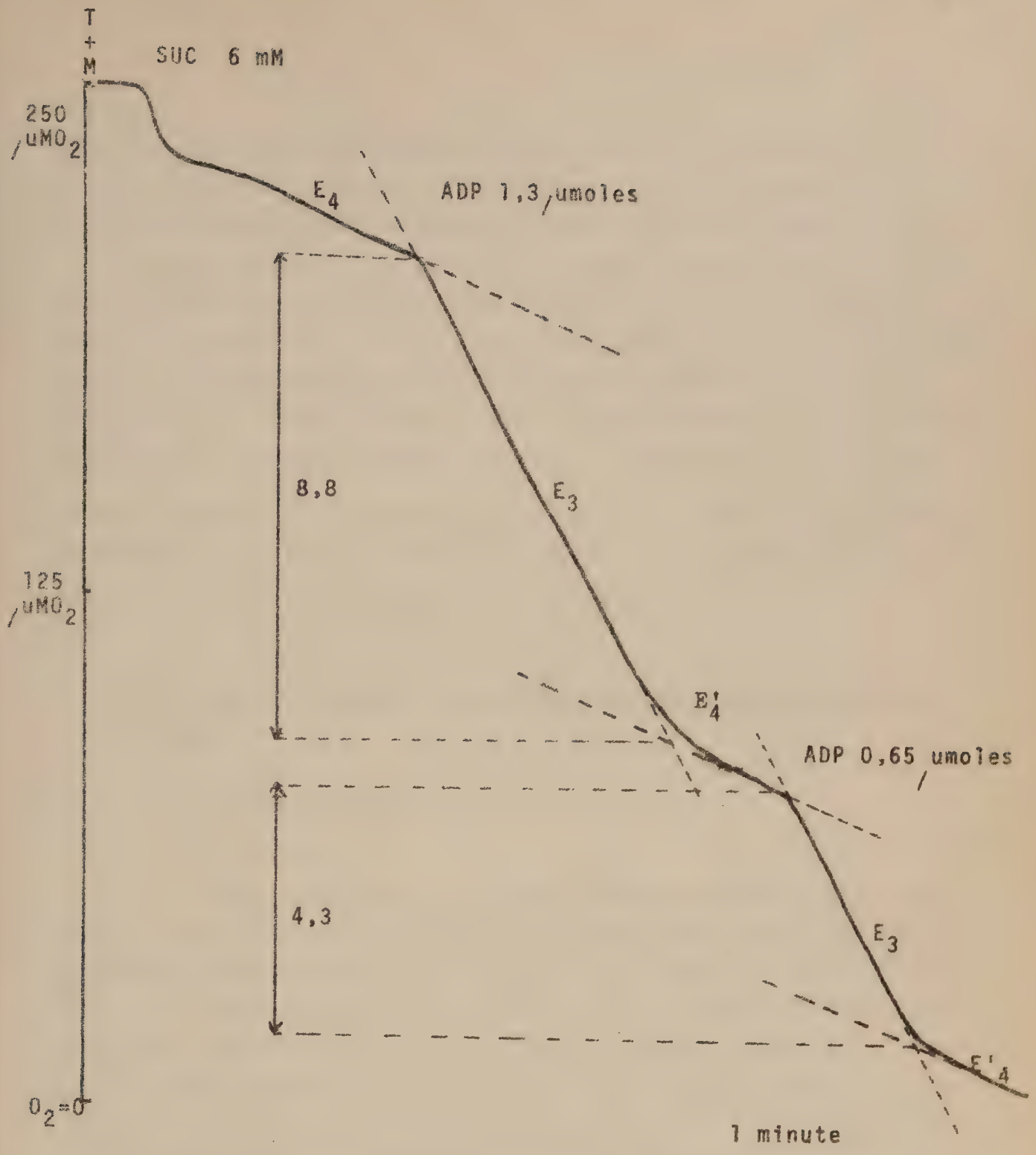


Figure 2 - Exemple d'enregistrement oxygraphique réalisé avec la cellule de CLARK.

M = mitochondries 2,4 mg protéines /ml

Tampon de CHANCE	K_2HPO_4	13mM
	KH_2PO_4	3mM
	$Mg\ Cl_2$	6mM
	KCl	58mM
	NaCl	25mM
	NaF	12mM

port des pentes en présence d'ADP et après sa consommation constitue l'index de contrôle respiratoire, ici, il est de 4,3. Les préparations convenables ont un rapport qui varie entre 3 et 5.

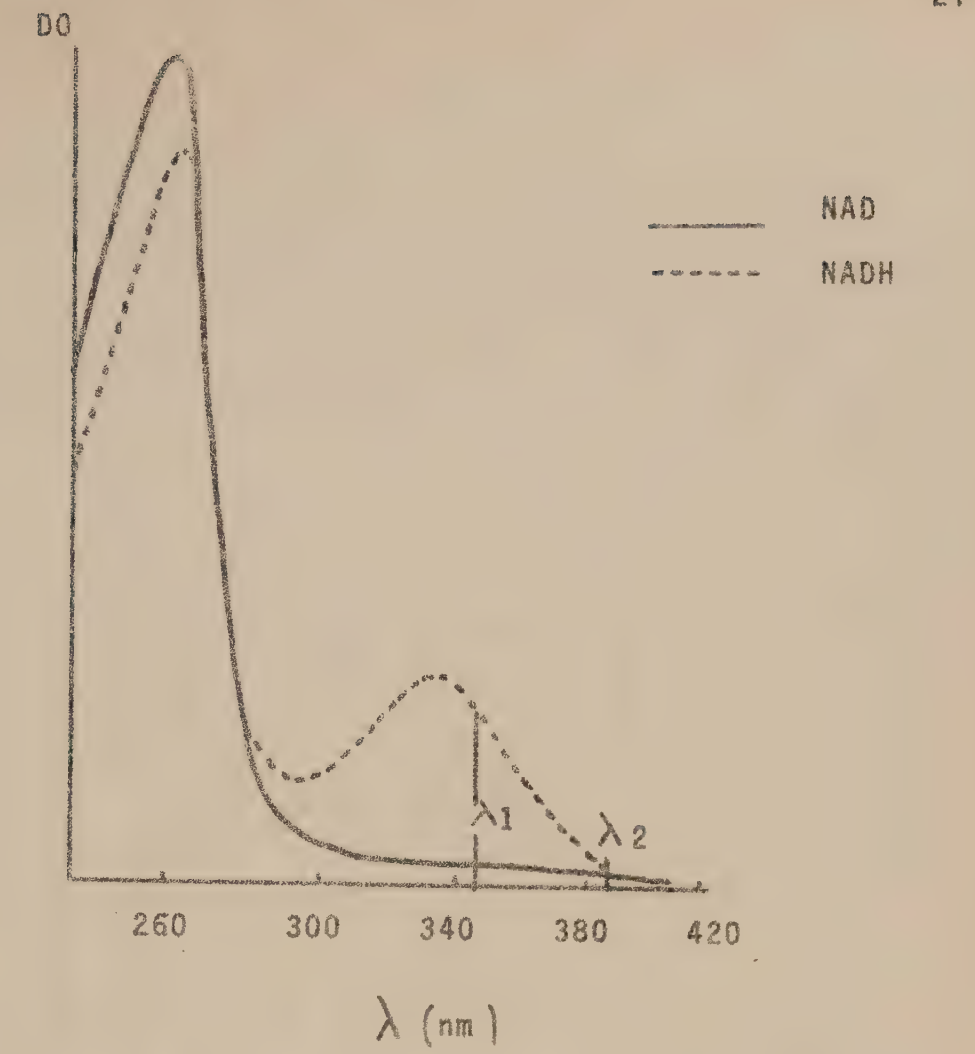
La concentration en oxygène du tampon est de 250 /uM au départ ce qui correspond à sa saturation à 25°C. 1 ml de tampon renferme donc à sa saturation 0,50 /u atomes d'oxygène. La cellule contenant 3 ml et la consommation de tout l'oxygène entraînant sur l'enregistrement un dénivellé de 18 cm, il s'ensuit que 1 cm correspond à $\frac{0,50}{18} \times \frac{3}{}$ = 0,08 /u atome d'oxygène. L'addition de 1,3 /u moles d'ADP produit un dénivellé de 8,8 cm il y a donc eu consommation de 0,08 x 8,8 = 0,70 /u atomes d'oxygène et le rapport P/O est $\frac{1,3}{0,7}$ = 1,85. La valeur théorique est de 2.

4) Mesures de l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires

a) Méthode cinétique

X Principe

Les changements de l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires sont suivis et enregistrés grâce à un spectrophotomètre différentiel mis au point par CHANCE (110,111,112,113, 114). Les formes oxydées et réduites des coenzymes respiratoires possèdent des spectres d'absorption différents, ceux-ci se coupent à certaines longueurs d'onde dites "points isobestiques". A ces longueurs d'onde, la densité optique est indépendante du degré d'oxydoréduction du coenzymes, l'une d'elles sert de référence (λ_2). La longueur d'onde de mesure (λ_1) est en général celle pour laquelle la variation de densité optique entre les formes oxydée et réduite est la plus grande. La figure 3 donne à titre d'exemple les spectres d'absorption des formes oxydées et réduites du NAD et du cytochrome c. Pour les différents coenzymes le tableau I rassemble les couples de longueur d'onde que nous avons utilisés



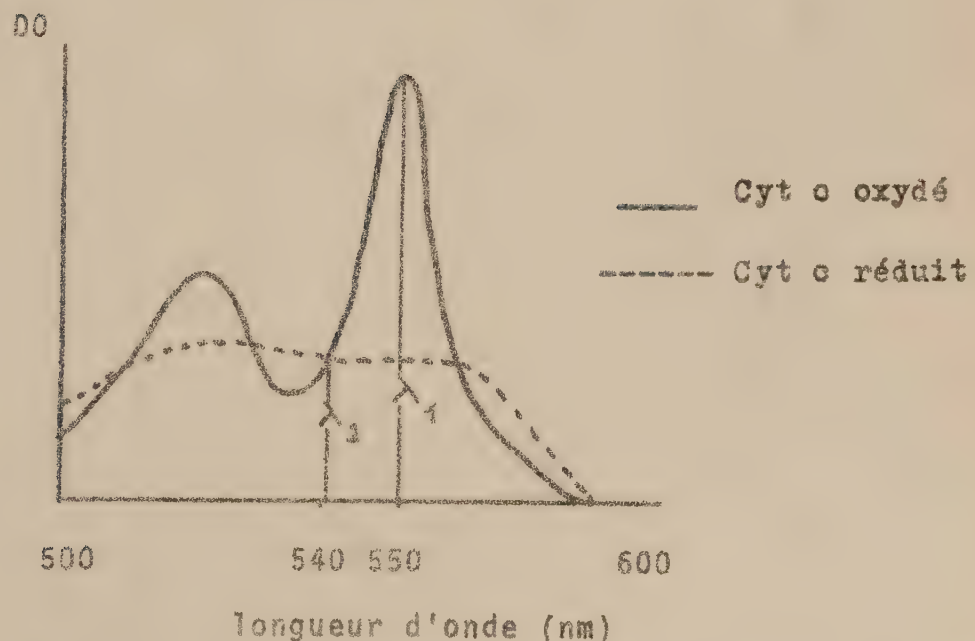


Figure 3 - Spectres d'absorption des formes oxydées et réduites du NAD (figure supérieure) et du cytochrome c (figure inférieure).

TABLEAU I

Couples de longueurs d'onde le plus couramment utilisés

	NAD	F_p	Cyt b		Cyt c	Cyt aa_3
	*	*	*	**	*	*
λ_2	350	510	575	430	540	630
λ_1	388	465	562	410	550	605
ε $(cm^{-1}mM^{-1})$		11	23	180	19	16

= Longueurs d'onde en nm

* = selon CHANCE (113)

** = selon CHANCE et WILLIAMS (191)

X Appareillage

Un système mécano-optique permet d'envoyer alternativement sur la suspension étudiée, des flashes de lumière monochromatique de longueur d'onde λ_1 et λ_2. La lumière transmise par l'échantillon est détectée par un tube photomultiplicateur d'électrons. Le signal amplifié, démodulé, est enregistré en continu. Les signaux correspondant aux deux longueurs d'onde sont égalisés par un atténuateur optique. L'enregistrement définit l'état d'oxydoréduction du coenzyme étudié et toute modification se traduit par un changement par rapport à la ligne de base.

Les principaux avantages de cet appareil résident dans sa très grande sensibilité. Il peut mettre en évidence des variations d'absorption de 0,002 à 0,02 unités de densité optique et ceci pour un milieu qui, au départ, absorbe notablement (D.O. de 2 à 3) ce qui est le cas des suspensions mitochondriales.

X Etats respiratoires de CHANCE

La respiration mitochondriale dépend de nombreux facteurs comme la température, la pression, la concentration en substrat et en oxygène, la présence d'inhibiteurs ou de découplants. LARDY le premier suggéra que l'ADP pouvait contrôler la vitesse respiratoire. Cette hypothèse fut développée par CHANCE (111,38) et SLATER (115) qui montrèrent que la respiration et par suite le degré d'oxydoréduction des constituants de la chaîne sont fonction du "potentiel phosphate" c'est-à-dire du rapport [ATP] / [ADP] [Pi] ; CHANCE, WILLIAMS et HOLLUNGER (116) ont normalisé les conditions générales qui affectent la respiration mitochondriale, leurs résultats sont rassemblés dans le tableau II .

A titre d'exemple, pour illustrer les états respiratoires, nous donnons un enregistrement (Figure 4) simultané de la respiration des mitochondries isolées (partie supérieure) et de l'état redox d'un coenzyme : ici les flavoprotéines (partie inférieure).

TABLEAU II

Etats respiratoires définis par CHANCE

Etats respiratoires	Substrat Exogène	Substrat Endogène	ADP	Oxygène	Respiration	Oxydoréduction des coenzymes
1	-	seul présent	-	en excès	lente	varié, dépend des mitochondries
2	-	avoisine zéro	+	en excès	très lente	oxydés
3 "activé"	+	+	+	en excès	rapide	oxydés
4 "contrôlé"	+	+	-	en excès	lente	partiellement réduits
5	+	+	-	0 anoxie	nulle	réduits

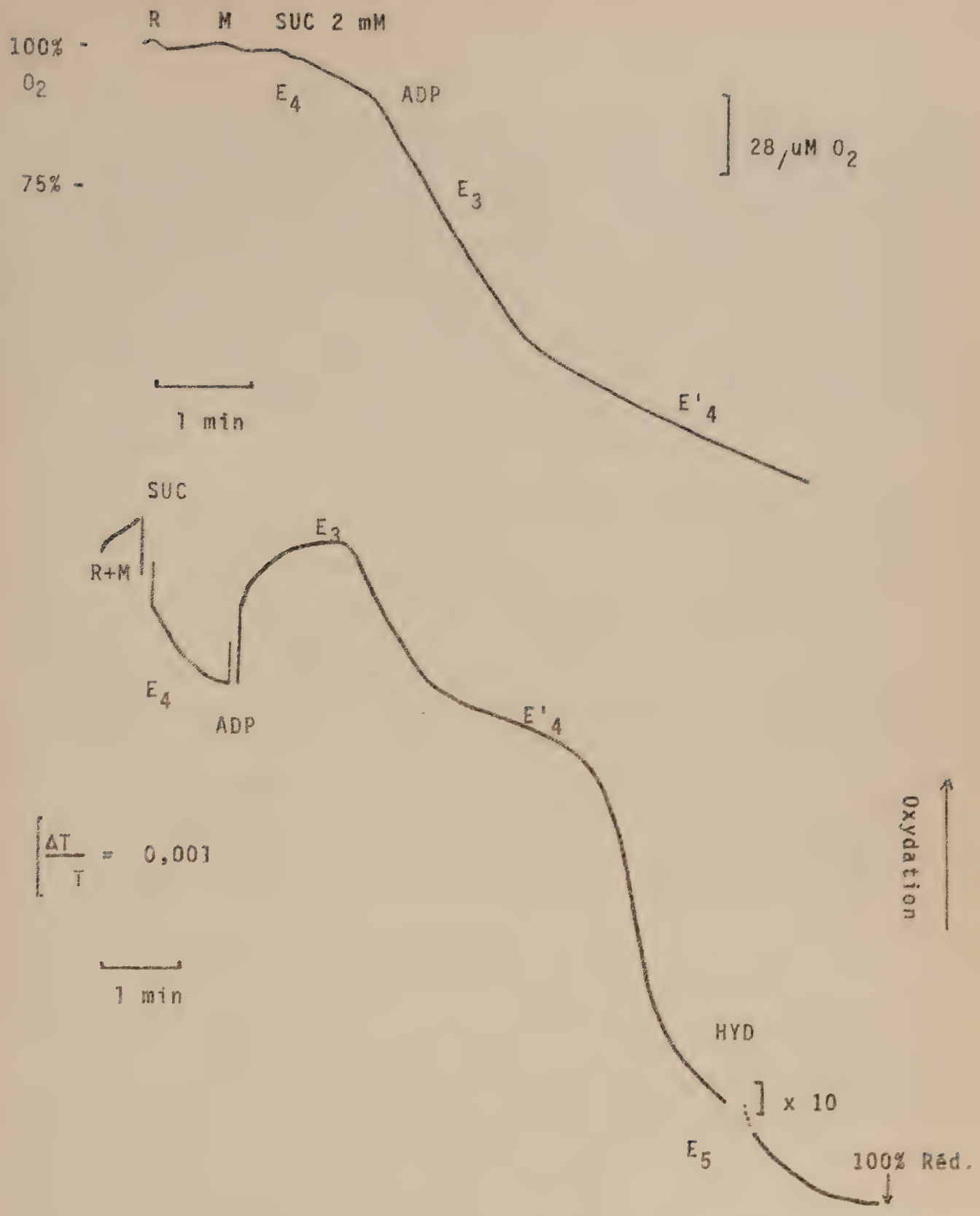


Figure 4 - Exemple d'enregistrements simultanés de la consommation d'oxygène réalisée avec l'électrode de CLARK (a) et de la mesure de l'état d'oxydo-réduction des flavoprotéines effectuée au spectrophotomètre à double longueur d'onde (465-510nm)

tampon de CHANCE
R : roténone 1,5 /uM
ADP : 0,9 mM
SUC : succinate de sodium 2 mM
M : mitochondries 2 mg de protéines/ml

L'enregistrement oxygraphique est réalisé dans la cellule à électrode de CLARK. La prise d'essai renfermant 6 mg de protéines mitochondriales est mise en suspension dans 3 ml de tampon complet de CHANCE contenant de la roténone (R) 1,5 uM. Le succinate de sodium (suc) utilisé comme substrat est ajouté à la concentration finale de 2 mM : la pente respiratoire correspond alors à l'état contrôlé (état 4). On ajoute de l'ADP 0,9 mM, la vitesse respiratoire s'accélère pendant l'état actif (état 3) puis on a rupture de la pente lorsque tout l'ADP est consommé : on retourne à l'état contrôlé (E'4).

Parallèlement nous suivons les variations de l'état redox des flavoprotéines au spectrophotomètre Aminco-CHANCE. Les longueurs d'onde utilisées sont λ_1 = 465 nm et λ_2 = 510 nm. On constate que l'addition de succinate provoque une légère réduction des flavoprotéines dûe à l'état 4, l'addition d'ADP provoque une oxydation ou état 3 , activé , puis on observe une réduction faible quand l'ADP est consommé : ce plateau met à nouveau en évidence l'état contrôlé, ensuite une réduction importante et rapide intervient quand l'anoxie se produit. A ce moment là les flavoprotéines sont réduites en forte proportion mais peuvent cependant subir une réduction chimique par l'hydrosulfite de sodium plus importante marquant le 100 p.cent de réduction.

b) Déterminations chimiques

X Dosage du NAD

Dans certains cas nous avons effectué des dosages des pyridine nucléotides afin d'obtenir des résultats quantitatifs. Le dosage de la forme oxydée (NAD) a été réalisé selon la méthode décrite par KLINGENBERG (117).

. Principe

Le NAD est réduit en présence d'éthanol par l'éthanol déshydrogénase (ADH) en NADH + H^+.

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{acetaldéhyde} + NADH + H^+$$

La réduction du NAD ne peut être rendue quantitative que si on opère en milieu alcalin, en présence de forte concentration d'éthanol, en captant l'acétaldéhyde formé par de la semicarbazide. On provoque la destruction du NADH préexistant par l'utilisation d'un acide fort ($HClO_4$), puis on réalise la réaction en milieu tamponné par du pyrophosphate qui retient les métaux lourds inhibiteurs de l'alcool déshydrogénase.

. Réactifs

$H Cl O_4$	70 p.cent	solution 3 N
KOH		solution 3 N
$K_2H PO_4$		solution 1 M
$Na_4P_2O_7$ 10 H_2O		solution 0,1 M pH 8,8 en présence de semi carbazide HCl

Ethanol absolu pour spectrophotométrie
Ethanol déshydrogénase (ADH)

. Extraction du NAD des mitochondries

On déprotéinise 1 ml de la suspension mitochondriale par 0,2 ml d'une solution d'acide perchlorique 3 N en évitant une trop grande dilution. On centrifuge 5 minutes à 4000g environ. On prélève 2 ml de surnageant que l'on plonge dans la glace et auquel on ajoute 0,2 ml de la solution de $K_2H PO_4$ puis en agitant vigoureusement on verse petit à petit la solution de potasse 3 N pour atteindre un pH compris entre 7,2 et 7,4. On laisse sédimenter le précipité de $K Cl O_4$ et le surnageant est recueilli pour les mesures spectrophotométriques.

. Mesures

Elles se font à 340 ou 366 nm sous 1 cm d'épaisseur, à la température ordinaire.

1 ml d'extrait
+ 1 ml de tampon pyrophosphate-semicarbazide
+ 0,02 ml éthanol

Après mélange on lit la densité optique D_1. On déclenche la réaction par addition de 0,02 ml d'ADH et on lit au bout de trois minutes la densité optique D_2

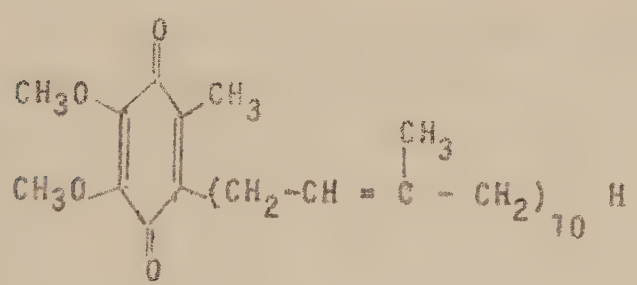
$$\Delta D = D_2 - D_1$$

$$\varepsilon_{(cm^{-1}\ \mu M^{-1})} = 6,22 \text{ à } 340 \text{ nm et } 3,30 \text{ à } 366 \text{ nm}$$

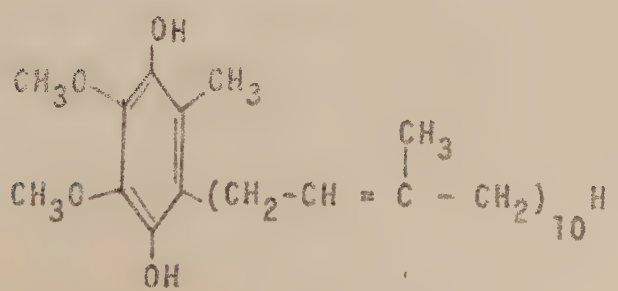
Le NAD peut être déterminé en même temps que l'ubiquinone par addition d'acide perchlorique au réactif d'extraction du coenzyme Q. Le NAD, localisé dans la phase aqueuse, est alors dosé selon la même technique.

X Dosage de l'ubiquinone

Selon le nombre des unités isoprénoïdes de la chaîne latérale en C_6, on distingue Q_6 Q_7 Q_8 Q_9 Q_{10} (118,119,120,121) ou ubiquinones. Nous avons utilisé le coenzyme Q_{10} pour les courbes d'étalonnage.



Q_{10} sous forme oxydée



Q_{10} sous forme réduite

On conserve l'ubiquinone à l'abri de la lumière car des radiations de longueur d'onde 360 nm et les radiations solaires provoquent des modifications spectrales en solution éthanolique. La propriété caractéristique du squelette paraquinonique est la facilité avec laquelle la forme quinone peut se réduire en forme quinolique. On obtient alors un déplacement du maximum d'absorption (Figure 5). Cette réaction a été mise à profit dans la méthode de dosage et conditionne par ailleurs son activité biologique. La détermination directe de l'état redox de l'ubiquinone au spectrophotomètre Aminco-CHANCE demande l'utilisation des filtres spéciaux (29), nous avons préféré la méthode chimique.

. Principe

La méthode utilisée a été décrite par KLINGENBERG (102,29,122). Elle comporte deux étapes : la première consiste à arrêter les réactions enzymatiques par dénaturation, la seconde comporte l'extraction de l'ubiquinone.

De nombreux agents de dénaturation ont été essayés : GREEN (123) préconise un acide fort, PUMPHREY (121) le méthanol à basse température.

Dans la méthode adoptée, KLINGENBERG constate que le méthanol à température ordinaire arrête immédiatement les réactions et l'extraction de l'ubiquinone est réalisée par addition simultanée d'éther de pétrole. Cette méthode permet de conserver le coenzyme Q dans son état d'oxydoréduction et d'étudier ses variations au cours de la respiration mitochondriale. On peut, au cours d'une seule manipulation, doser également le NAD par addition d'acide perchlorique au mélange d'extraction méthanol-éther de pétrole. Le NAD, préservé de toute altération de son état redox, demeure dans la phase aqueuse, tandis que l'ubiquinone se trouve dans la phase éthérée.

En outre, l'acide perchlorique pourrait accélérer l'extraction des coenzymes dans leur état d'équilibre (29).

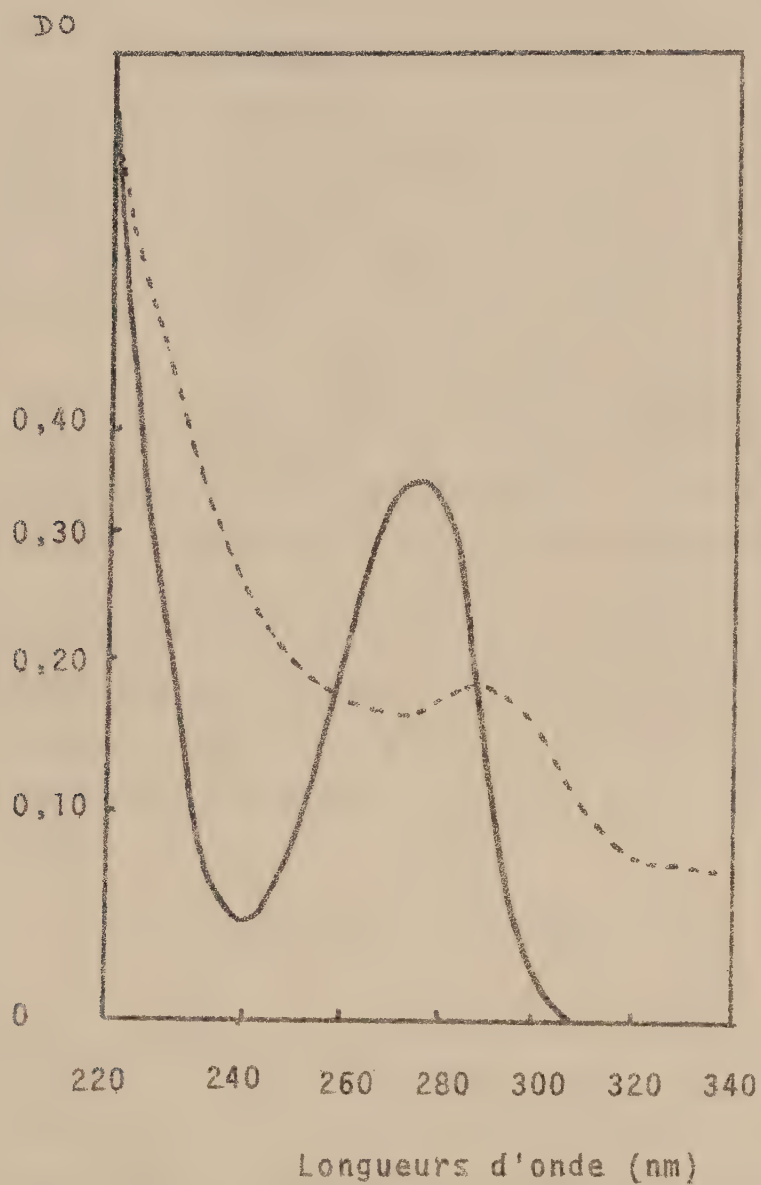


Figure 5 - Spectres d'absorption de l'Ubiquinone (——) Q_{10} en solution dans le mélange heptane-éthanol (25-75 v/v) avec un maximun à 275 nm et de l'Ubiquinol (---) obtenupar réduction avec du borohydrure de sodium: maximum à 290 nm.

. Réactifs

Les solvants utilisés dans l'extraction et pour les déterminations spectrophotométriques doivent être très purs.

Méthanol
Ether de pétrole (40-60)
$H\ Cl\ O_4$
$Na\ B\ H_4$
$FeCl_3\ 6\ H_2O$
Heptane
Ethanol absolu

. Mode opératoire

Un volume de la suspension mitochondriale contenant 6 à 10 mg de protéines est agité à température ordinaire avec 3 ou 4 volumes de mélange d'extraction : Méthanol-éther de pétrole (70-30 V/V) contenant 0,2 M d'acide perchlorique.

L'extrait est centrifugé à 1.500g. La phase supérieure éthérée est recueillie. L'extraction est répétée trois fois par addition d'éther de pétrole. Les phases solvants sont réunies et évaporées sous vide à 30°C à l'aide d'un Rotavapor type Buchli. Le résidu sec est repris dans 3 ml de solvant heptane-éthanol (25-75 V/V).

. Mesures spectrophotométriques

Pour le dosage de l'ubiquinone totale, nous avons suivi la méthode de KLINGENBERG. Nous mesurons la diminution d'absorption à 280-289 nm produite par addition de 2 µl de solution de borohydrure de sodium (10 mg/ml H_2O). On obtient ainsi la quantité d'ubiquinone qui se trouve sous forme oxydée. La somme UQ_{ox} + $UQ_{réd}$ est déterminée de la même façon après réoxydation de $UQ_{réd}$ par incubation de la solution heptane-éthanol (3 ml) avec 50 µl d'une solution de chlorure ferrique pendant 10 heures (0.

$Fe\ Cl_3\ 6\ H_2O$ par ml de méthanol). Le coefficient d'extinction différentiel 280-289 nm est

$$\Delta\varepsilon_{(ox-red)} = 8{,}8\ mM^{-1} x\ cm^{-1}$$

Pour certaines déterminations de l'ubiquinone oxydée seule nous avons utilisé la différence d'absorption à 275 nm avant et après réduction par le borohydrure de sodium. Le coefficient d'extinction calculé par CRANE (125) est alors $12{,}2\ mM^{-1} x\ cm^{-1}$.

Les mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre Cary à double faisceau, la cuve de référence contenant le solvant seul

. Vérifications de pureté

Les substances absorbant fortement en ultraviolet risquant de gêner le dosage, nous avons vérifié que le spectre de la vitamine A (124,126) présente en grandes quantités dans le foie, n'était pas modifié par l'addition de borohydrure de sodium et ne risquait donc pas d'interférer. Ces résultats sont représentés par les spectres de la figure 6 .

Les techniques générales qui viennent d'être exposées ne seront pas répétées dans les chapitres suivants, seules les conditions expérimentales particulières seront décrites.

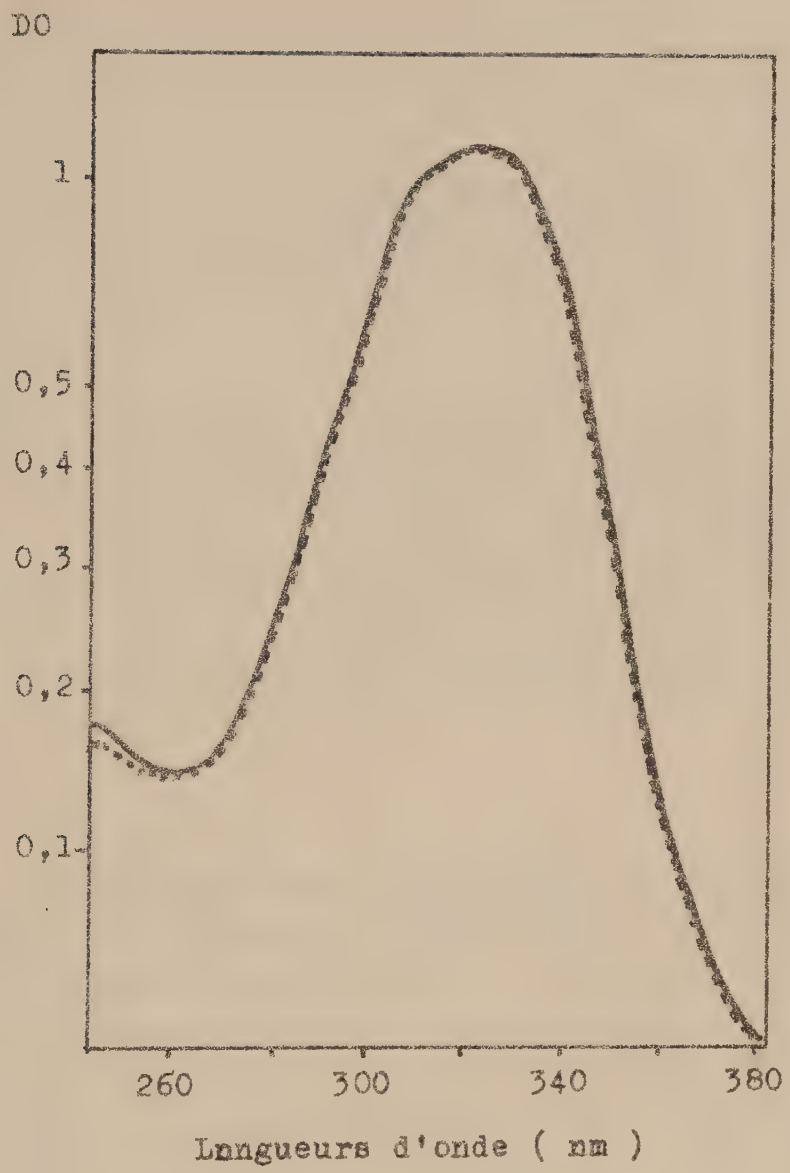


Figure 6 - Spectres d'absorption de la Vitamine A (——) en solution dans le mélange heptane-ethanol (25-75 v/v) et en présence de borohydrure de sodium (----)

$NaBH_4$: 2 µl d'une solution aqueuse à 10 mg/ml dans 3 ml de la solution de Vitamine A dans le mélange heptane-ethanol.

C H A P I T R E II

METABOLISME MITOCHONDRIAL DES IODOTHYRONINES EN RELATION AVEC LEURS EFFETS RESPIRATOIRES SUR LES PARTICULES ISOLEES DE FOIE DE RAT

Les iodothyronines administrées à l'animal n'agissent qu'après une période de latence (127). Ce délai peut s'expliquer de deux façons principales, on a supposé d"une part qu'il dépendait du temps nécessaire à la pénétration des hormones thyroïdiennes vers le milieu intracellulaire puisque la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine agit plus rapidement et plus intensément que la L-thyroxine, ce qui est en accord avec le fait que la vitesse de pénétration intracellulaire pour le dérivé triiodé est supérieure à celle de l'hormone tétraiodée (128); on a envisagé, d'autre part, que les réponses hormonales pourraient correspondre à la formation d'un métabolite actif (129).Cependant on a montré antérieurement que lors de l'effet de la thyroxine sur la morphologie des mitochondries isolées, l'hormone ne subissait aucun changement décelable bien que différentes enzymes pouvant dégrader T_4 aient été caractérisées dans les mitochondries (130). Nous avons repris ce travail afin d'étudier le métabolisme de la L-thyroxine et de

3,5,3'-triiodo-L-thyronine lorsqu'elles provoquent des modifications de la respiration des mitochondries placées dans divers états thermodynamiques. Nous nous sommes attaché à réaliser des essais dans des conditions respiratoires diverses (inhibitrices ou activatrices) en modifiant soit la concentration du substrat (131), soit celle des hormones de façon à essayer de déterminer si l'intensité des effets était liée par exemple à des modifications de pénétration du phénol iodé à l'intérieur de la mitochondrie.

I- Conditions expérimentales

Ces recherches ont été entreprises avec de la L-thyroxine (T_4) et de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) marquées par ^{131}I en ortho de la fonction phénol.

1) Mesures de la consommation d'oxygène

La vitesse de respiration des mitochondries est enregistrée systématiquement à chaque expérience.

Les mesures de consommation d'oxygène sont suivies à l'électrode vibrante, les mitochondries étant en suspension dans le tampon CHANCE (voir p. 19). Dans tous ces essais nous avons employé la méthode de WILSON et MERZ(132) qui consiste à ajouter les divers effecteurs et l'ADP (s'il y a lieu à la concentration de 0,32 mM) avant le substrat qui déclenche la réaction. Les substrats employés à différentes concentrations sont soit le succinate de sodium en présence de roténone 0,7 µg/ml, soit le β hydroxybutyrate de sodium (β OHB) avec du malonate de sodium 3 mM. Les concentrations finales de protéines mitochondriales sont généralement comprises entre 1,3 et 1,7 mg par ml. Les pourcentages d'inhibition ou d'activation respiratoires sont calculés par rapport à un témoin où l'effecteur est remplacé par son solvant, ici le solvant des iodothyronines marquées : soude N/10, eau, propylène glycol : 0,1/0,9/0,002 : V/V). Toutes ces opérations sont chronométrées afin de se placer dans des conditions comparables d'une fois à l'autre.

2) Pénétration

Pour étudier la pénétration de T_4 ou de T_3 dans les mitochondries nous avons comparé la radioactivité des suspensions mitochondriales et des filtrats exempts de particules. Cette opération est réalisée à partir de prises d'essai de 0,2 ml environ au moyen d'une seringue sur laquelle on fixe un porte-filtre muni d'une paroi millipore de 0,8 µ; par pression on obtient des solutions limpides. Ces diverses manipulations exigent moins de 15 secondes. Les prélèvements sont effectués 15 secondes ou 1 minute après l'addition du substrat. Les mesures de radioactivité sont pratiquées grâce à un compteur à cristal creux (Autogamma Packard), sur une partie aliquote, avant et après filtration de la solution. Des expériences témoins effectuées sans mitochondries indiquent que les filtres et le verre retiennent moins de 10 p.cent de la radioactivité du milieu.

3) Métabolisme des iodothyronines

Cette étude met en oeuvre principalement des techniques chromatographiques.

Une vérification de pureté de l'hormone radioactive est effectuée par chromatographie descendante en présence de deux sortes de solvants : le n.butanol saturé par NH_4OH 2N et le n.butanol acétique. On ajoute à l'échantillon d'hormone radioactive des entraîneurs dans les mêmes proportions que celles trouvées lors du contrôle. Nous avons vérifié que les solutions radioactives ou froides produisaient les mêmes effets sur le fonctionnement mitochondrial.

Des prises d'essai de 0,025 ml de suspension mitochondriale sont prélevées une minute après le début de la réaction par le substrat et déposées telles quelles sur des chromatogrammes et séchées immédiatement. On place un témoin marginal de solution

Radioactivité spécifique
L-Thyroxine = 37 mCi/mg
3,5,3'-triiodo-L-thyronine = 25 mCi/mg

hormonale marquée, un autre renfermant les mitochondries est effectué à 0°C et en présence d'Antimycine A (0,6 µg/ml) qui inhibe la respiration. Après migration en butanol acétique et en n.butanol saturé par NH_4OH 2N, les chromatogrammes sont découpés en bandes longitudinales et la radioactivité est enregistrée au moyen d'un compteur β 4π (Scanner Packard). Un contrôle supplémentaire est réalisé en mettant les chromatogrammes sous film et en comptant la radioactivité des taches correspondant aux iodures et à l'hormone (Figure 7) sur les radioautogrammes.

Il ressort d'expériences préliminaires effectuées sans mitochondries et en ajoutant $^{131}I^-$ à la solution hormonale radioactive qu'une variation de 5 p.cent de la quantité d'iodure est repérable (Figure 8). Les solutions d'iodothyronines marquées utilisées renferment au maximum 5 p.cent d'iodure, il est dès lors possible de déceler une désiodation de l'ordre de 5 p.cent.

II- Résultats

Ces essais sont conduits en état 3 et en état 4 en présence de deux sortes de substrats : le succinate de sodium d'une part et le β hydroxybutyrate de sodium d'autre part.

1) Consommation d'oxygène

Les résultats expérimentaux concernant l'inhibition de la consommation d'oxygène des mitochondries placées dans l'état 3 par la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine et la L-thyroxine sont rassemblés dans le tableau III

Les vitesses d'oxydation du substrat sont exprimées en concentration finale d'oxygène (µ moles/l) consommées par minute et par mg de protéines mitochondriales. Pour chaque essai il est indiqué la respiration avec et sans hormone ainsi que l'inhibition correspondante.

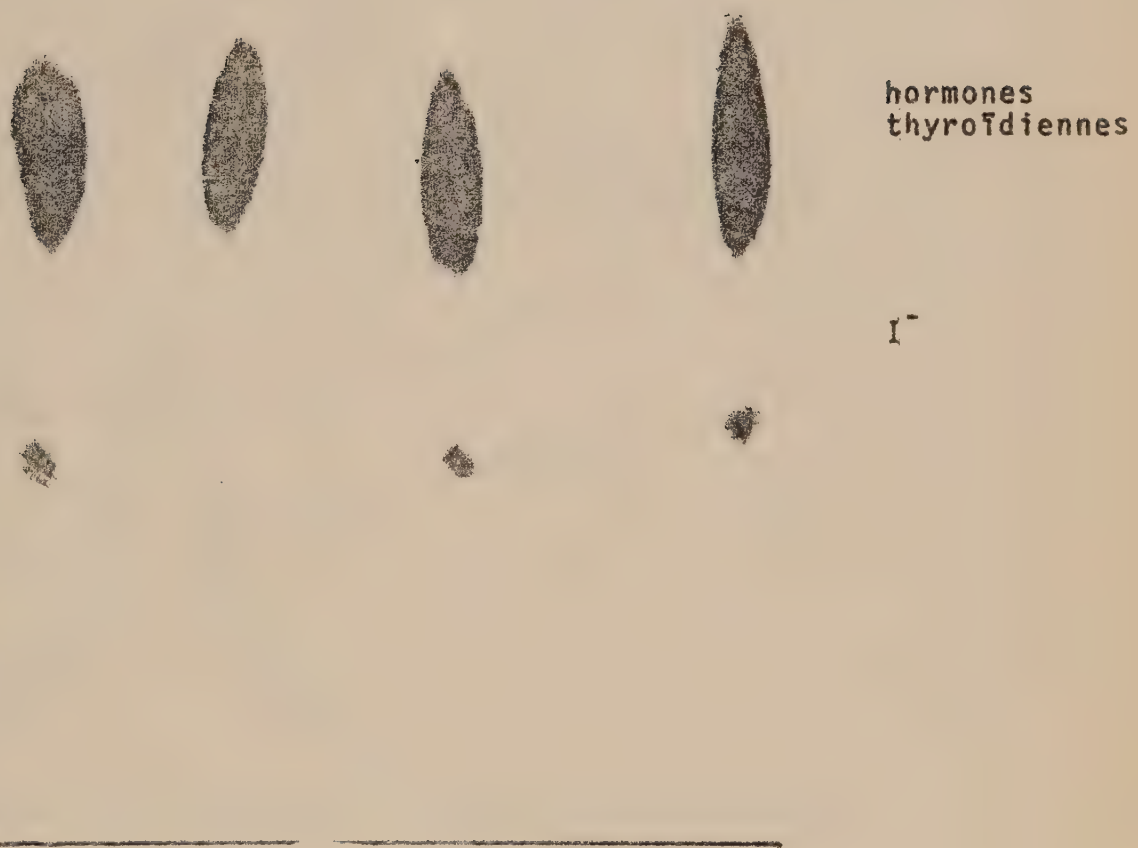


Figure 7 - Radioautogramme après chromatographie en n.butanol saturé par NH_2OH 2N

en bas : ligne de départ

La première tache correspond aux iodures.
La deuxième tache correspond aux hormones thyroïdiennes

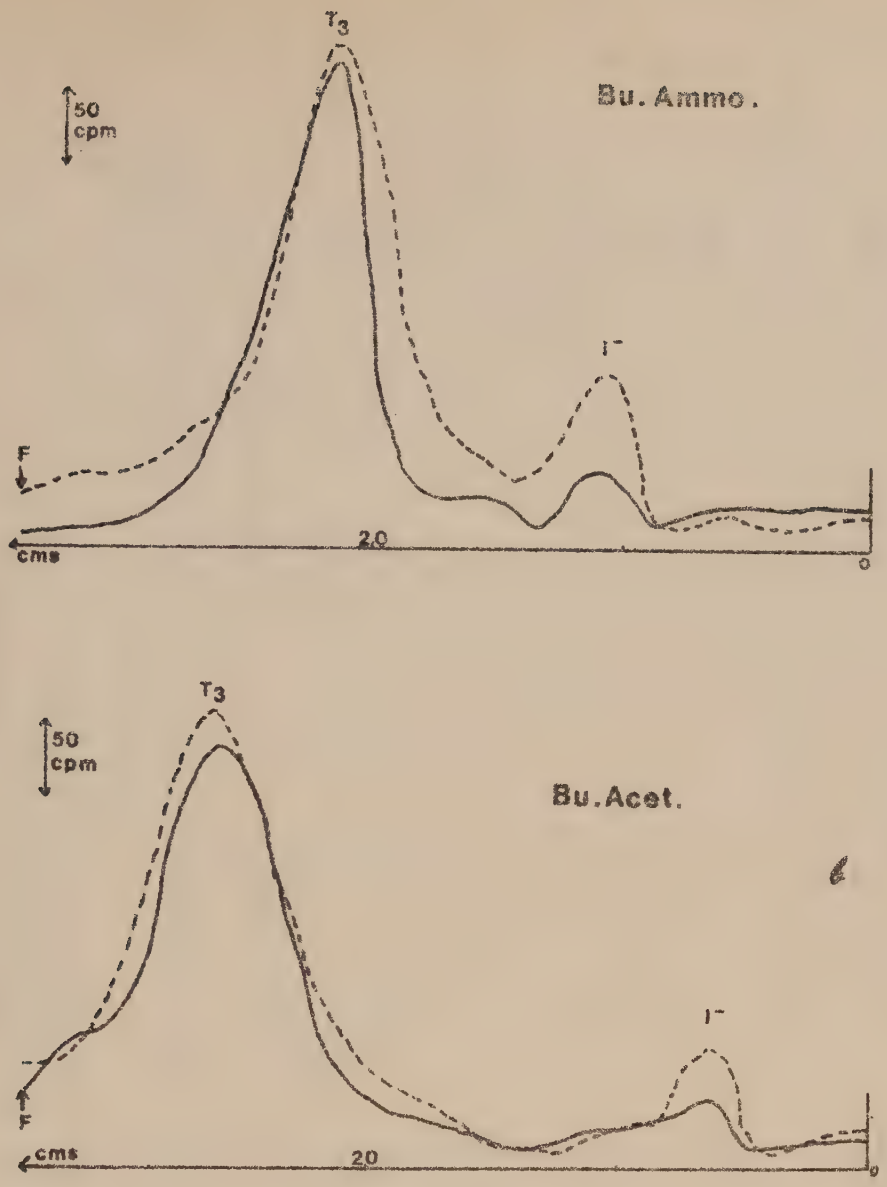


Figure 8 - Enregistrements de radiochromatogrammes

a : migration en n-butanol saturé par NH_4OH 2N

b : migration en butanol acétique

—— migration d'un mélange contenant l'hormone radioactive $^*T_3$ en présence de mitochondries en milieu tamponné et additionné d'hormone froide.

---- le mélange mis à migrer a été additionné de 5p.100 de Iodure de sodium marqué par ^{131}I.

On voit sur les documents les pics correspondant aux iodures I^- et à la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine T_3

0 = origine
F = front

cpm = coups par minute
cms = centimètres

TABLEAU III

Inhibition respiratoire produite par la L-thyroxine
et la 3,5,3' triiodo-L-thyronine
sur des mitochondries en état 3 sous concentrations variables de substrat

Substrat	vitesses respiratoires en µM O_2 x minutes^{-1}xmg^{-1} protéines mitochondriales								
	Expérience I			Expérience II			Expérience III		
	sans T_3	T_3	%I	sans T_3	T_3	%I	sans T_4	T_4	%I
Succinate 2mM	10,6	9,0	14	15,9	12,0	24	51,1	38,7	24
12mM	20,6	20,4	0,9	25	22,6	9	78,9	74,5	5,5
βOHB 2mM	-	-	-	-	-	-	4,4	2,8	37
3,5mM	4,8	3,4	30	-	-	-	-	-	-
14mM	6,7	6,1	9	-	-	-	10,6	8,8	16,5

βOHB = β hydroxybutyrate de sodium
%I = pourcentage d'inhibition respiratoire

Exp. I : T_3 = 10 µM
Exp.II : T_3 = 25 µM
Exp.III: T_4 = 10 µM

ADP = 300 µM

Il ressort du tableau III que pour une même dose de phénol iodé l'inhibition respiratoire dans l'état 3 est plus forte avec les plus faibles concentrations de succinate ou de β hydroxybutyrate, ce qui confirme les données antérieures (131).

2) Pénétration

On peut dès lors se demander si l'existence de ce phénomène est liée à un changement dans la vitesse de pénétration des produits hormonaux quand on fait varier la teneur en substrat. Nos expériences étant réalisées dans des conditions respiratoires variées (activation ou inhibition) on détermine le pourcentage d'hormone pénétrant dans la mitochondrie par rapport à la quantité totale.

Une première série d'expériences a été entreprise pour étudier les pourcentages de T_3 (Tableau IV a et b) ou de T_4 (Tableau V) retenus dans la mitochondrie en fonction de concentrations variables de substrat. Ces expériences sont effectuées à 25°C et la filtration a lieu une minute après l'addition du substrat.

Les chiffres obtenus mettent en évidence le fait qu'avec des inhibitions respiratoires très différentes les pourcentages d'iodothyronine fixée restent sensiblement les mêmes. Ces faits nous ont amenés à suivre la vitesse de fixation des hormones par les particules. Les tableaux VI et VII montrent que la quantité maximale de produits est captée en moins de 15 secondes.

Enfin, nous avons voulu étudier l'influence de la température sur la pénétration hormonale. Le tableau VIII donné à titre d'exemple rend compte d'expériences pratiquées avec T_3 à 0°C et à 25°C. Les résultats sont semblables dans les deux cas, ce qui permet de considérer que la température n'intervient très vraisemblablement pas sur la quantité d'hormone retenue. Les diminutions de la température influencent la vitesse de consommation d'oxygène, facteur utilisé dans les expériences du dernier chapitre.

TABLEAU IV (a)

Pourcentages de T_3 fixée par les mitochondries
en fonction de la concentration en substrat

concentration T_3 /uM	SUCCINATE mM									
	0°C + AA	1		2		6		10		12	
	capté	Inh.	capté	Inh.	capté	Inh.	capté	Inh.	capté	Inh.	Capté
10	75	16	79,5	15,6	71,3	7	70,6	5	80,2	0	83
		12,5	85,4								
100	68,5	81	71	-	-	71,5	71,5	-	-	-	-

Expérience réalisée en état 3 à 25°C. Filtration 1 minute après l'addition du substrat

ADP = 300 /uM
AA = Antimycine A 0,6 /ug/ml

Inh = pourcentage d'inhibition respiratoire
capté = pourcentage de T_3 captée par les particules

TABLEAU IV (b)

Pourcentages de T_3 fixée par les mitochondries
en fonction de la concentration en substrat

concentration T_3 /uM	β HYDROXY BUTYRATE mM								
	0°C + AA	1		3,5		7		14	
	capté	Inh.	capté	Inh	capté	Inh.	capté	Inh.	capté
20	83	-	-	35	81	-	-	12	82
25	80	27	84	-	-	31	89	20	82,5
50	85	-	-	41	81,5	-	-	39	70,5
100	76,5	59	82,5	-	-	55	82	54	83,5

Expérience réalisée en état 3 à 25°C. Filtration 1 minute après l'addition du substrat

ADP = 300/uM

AA = Antimycine A 0,6/ug/ml

Inh. = pourcentage d'inhibition respiratoire

capté = pourcentage de T_3 captée par les particules

TABLEAU V

Pourcentages de L-thyroxine fixée par les mitochondries
en fonction de la concentration en substrat

concentration T_4 µM	SUCCINATE mM					β HYDROXYBUTYRATE mM		
	0°C + AA	1	2	6	12	0°C + AA	2	14
10	73,5	65	82	75	74	81,5	73	72
50	74	74,5	-	72,2	-	72	80	74

mêmes conditions expérimentales que dans le tableau IV

TABLEAU VI

Vitesse de pénétration de la 3,5,3' triiodo-L-thyronine dans les mitochondries

concentration T_3 /uM	SUCCINATE 1mM		SUCCINATE 10mM	
	15"	1'	15"	1'
10	78,4	85,4	85,4	80,2
50	85,4	91,6	82,5	79

Les chiffres indiqués représentent le pourcentage d'hormone retenue dans les mitochondries.

Les conditions expérimentales sont celles du tableau IV

Les inhibitions respiratoires (Inh) sont :

T_3 10/uM Succinate 1mM Inh = 12,5 %
10mM Inh = 5 %

T_3 50/uM Succinate 1mM Inh = 39 %
10mM Inh = 29,5 %

TABLEAU VII

Vitesse de pénétration de la L-thyroxine dans les mitochondries

concentration	SUCCINATE mM		β HYDROXYBUTYRATE mM			
	6		2		14	
T_4 µM	15"	1'	15"	1'	15"	1'
10	70	75	70,5	73	70,4	72
50	82	72,2	-	-	-	-

Mêmes légendes que celles du tableau IV

Les inhibitions respiratoires (Inh) sont :

T_4 10 µM — Succinate 6mM — Inh = 15,9 %

β hydroxybutyrate 2mM — Inh = 36 %

14mM — Inh = 18 %

T_4 50 µM — Succinate 6mM — Inh = 44 %

TABLEAU VIII

Fixation de la 3,5,3' triiodo-L-thyronine
à deux températures avec des concentrations variables de substrat

concentration	SUCCINATE 1 mM		SUCCINATE 6 mM		ANTIMYCINE A (0,15 µM)	
T_3 µM	25°C	0°C	25°C	0°C	25°C	0°C
10	79,6	77,8	70,6	85	75	81,4
100	71	74	71,5	84,5	68,5	-

Les chiffres indiqués sur le tableau représentent le pourcentage d'hormones ayant pénétré dans les mitochondries.

Les conditions expérimentales sont celles du tableau IV .

En conclusion, il ressort que la captation des iodothyronines par les particules est très rapide puisqu'un maximum est atteint en moins de 15 secondes et que le pourcentage reste sensiblement le même quelles que soient les conditions expérimentales, en particulier, il est indépendant de la température et de l'effet sur les oxydophosphorylations.

3) Métabolisme

Pour cette étude nous avons reproduit quelques enregistrements de radiochromatogrammes en présence des tracés oxygraphiques correspondants. La figure 9 illustre les résultats obtenus avec des mitochondries respirant en état 4 avec du succinate 6 mM comme substrat et en présence soit de T_3 100 ou 200 µM, soit de son solvant (expérience témoin). Sur la partie supérieure de la figure sont représentés les enregistrements oxygraphiques, la faible dose de T_3 active la respiration de 18 p.cent, la forte l'inhibe de 30 p.cent. L'enregistrement chromatographique en trait plein correspond à une expérience témoin réalisée à 0°C où le transfert des électrons est bloqué par l'Antimycine A. Il ressort de ces documents qu'il n'y a pas de différences significatives entre ces chromatogrammes, en particulier aucune désiodation n'est décelable.

La figure 10 rend compte d'une expérience avec des mitochondries placées en état 3, c'est-à-dire en présence d'ADP. Une même concentration de T_3 de 25 µM provoque dans les deux essais une inhibition respiratoire qui varie du simple au double en fonction de la concentration du substrat : 25 p.cent environ avec du succinate 2 mM, 10 p.cent avec 12 mM. Des observations semblables aux précédentes ressortent de l'examen des radiochromatogrammes correspondants.

La figure 11 illustre une expérience réalisée avec le β hydroxybutyrate et T_3 agissant en état 3 : une inhibition respiratoire se manifeste et ceci toujours sans modification de la structure hormonale.

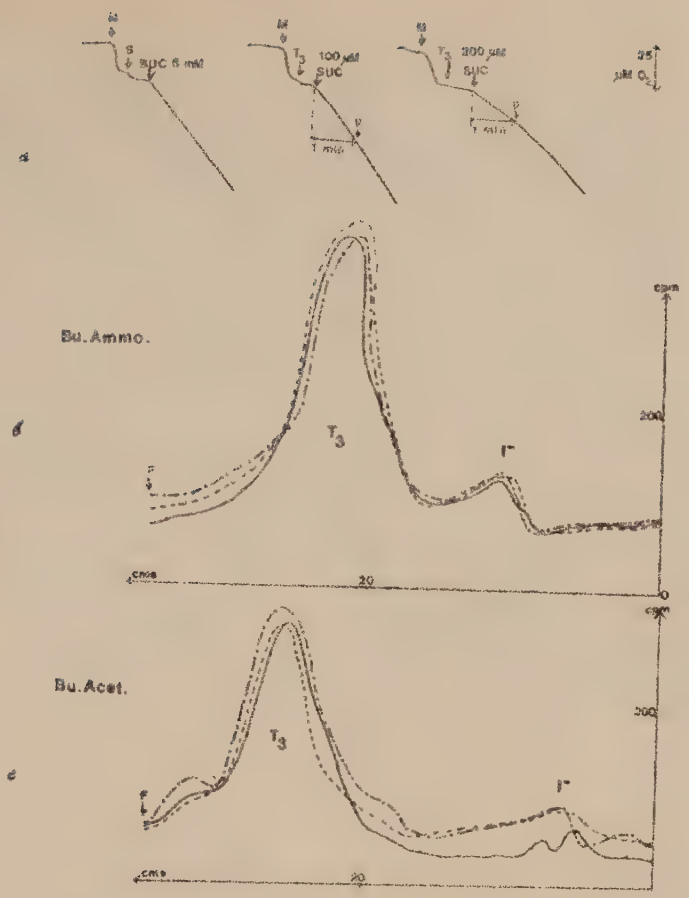


Figure 9 - Métabolisme de la 3,5,3' triiodo-L-thyronine (T_3) au cours de son action sur la respiration des mitochondries placées dans l'état 4 en présence de succinate 6mM.

a : enregistrements oxygraphiques

M = mitochondries — Suc = succinate de sodium 6mM
S = solvant (expér. témoin)
p = prélèvement — min = minute
T_3 100/uM activation respiratoire de 18p.100
T_3 200/uM inhibition respiratoire de 30p.100

b : radiochromatogramme sur papier Whatman en n.butanol saturé par NH_4OH 2N

c : radiochromatogramme en n.butanol acétique

o = origine — cpm = coups par minute
F = front — cms = centimètres

——— expérience témoin à 0°C et en présence d'Antimycine A qui bloque la respiration
- - - - - - - expérience en présence de T_3 marqué à la concentration de 200/uM avec du succinate 6mM
-.-.-.-.- même concentration de succinate mais T_3 marqué = 100/uM

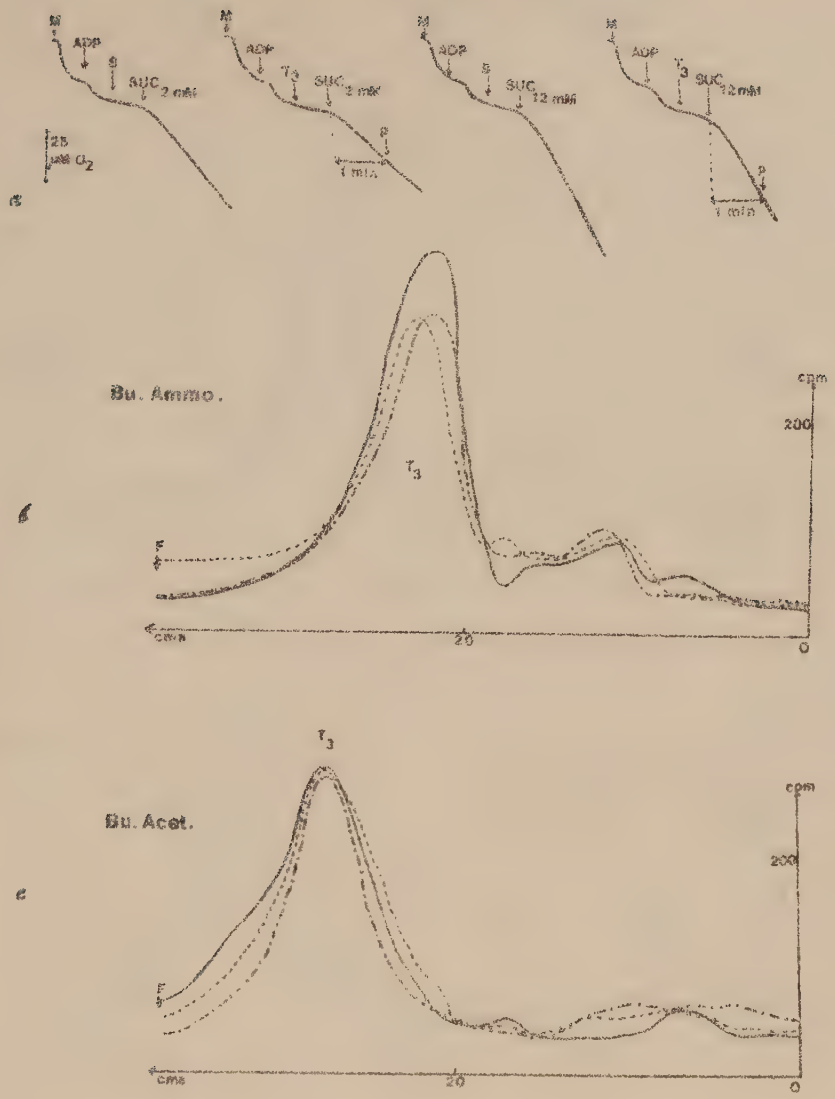


Figure IO - Métabolisme de T_3 au cours de son action sur la respiration des mitochondries placées dans l'état 3 en présence de succinate.

a : enregistrements oxygraphiques (même légendes que figure 9)

ADP = 300/uM

T_3 = 25/uM inhibition respiratoire de 25p.100 avec Suc 2mM, 10p.100 avec Suc12mM

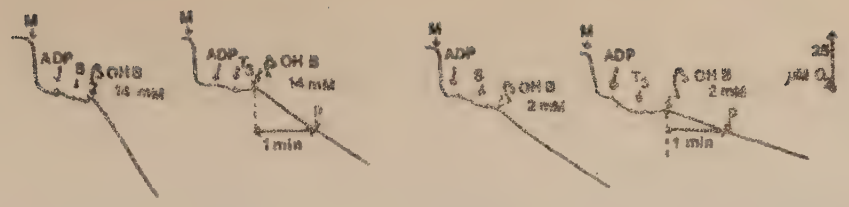
b : radiochromatogramme en n.butanol saturé par NH_4OH 2N

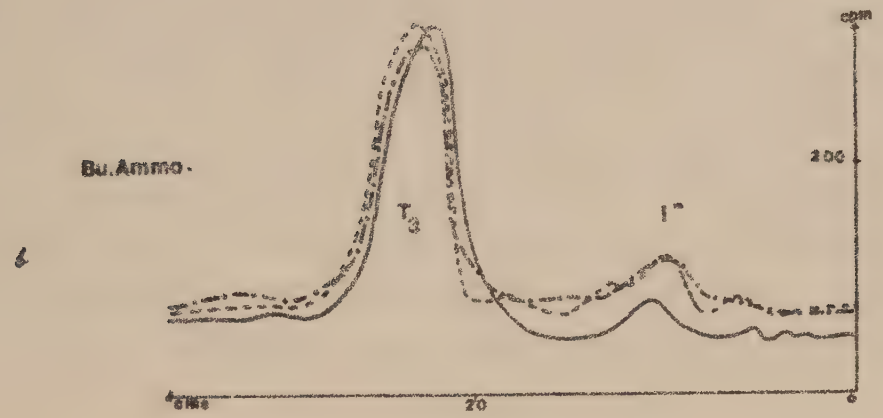
c : radiochromatogramme en n.butanol acétique (mêmes légendes que figure 9)

——— expérience témoin

----- T_3 marqué = 25/uM et succinate de sodium 12mM

-.-.- même concentration de T_3 mais succinate de sodium 2mM





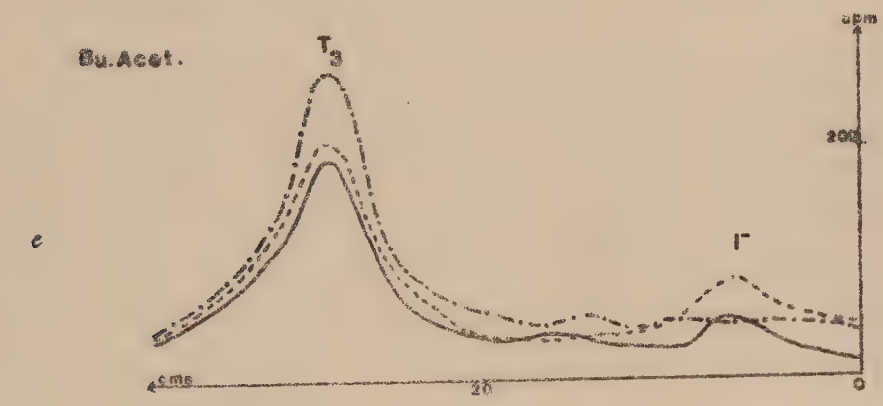


Figure II - Métabolisme de T_3 au cours de son action sur la respiration des mitochondries placées dans l'état 3 en présence de β hydroxybutyrate de sodium (β OHB).

a : enregistrements oxygraphiques (mêmes légendes que figure 9)

ADP = 300/uM

T_3 = 100/uM inhibition respiratoire de 42,5p.100 avec β OHB 2mM et 52p.100 avec β OHB 14mM

b : radiochromatogramme en n.butanol saturé par NH_4OH 2N

c : radiochromatogramme en n.butanol acétique (mêmes légendes que figure 9)

—— expérience témoin

---- T_3 marqué = 100/uM et β OHB = 14 mM

-·-·- même concentration de T_3 mais β OHB = 2 mM

Les figures suivantes 12, 13 et 14 rendent compte d'expériences analogues réalisées avec la L-thyroxine. On s'est placé dans des conditions où se manifestent une activation respiratoire avec le succinate en état 4 et une inhibition en état 3 avec les deux substrats. Au cours de ces essais il n'a jamais été possible de déceler des changements de structure des iodothyronines, en particulier on n'a jamais pu mettre en évidence une dégradation même faible, ce qui semble montrer que le métabolisme des hormones thyroïdiennes et leur mécanisme d'action sur les mitochondries isolées constituent sans doute deux réactions indépendantes.

III- Discussion et conclusions

Il ressort de notre travail que la captation des iodothyronines par les mitochondries ne semble pas procéder d'un mécanisme actif bien qu'il soit intense et relativement rapide. Ce résultat est en accord avec des données antérieures établies avec des suspensions mitochondriales en milieu tamponné en l'absence de substrat oxydable et dans des conditions où l'isolement des particules exigeait un temps plus long que celui adopté dans nos expériences (130).

Les mitochondries ne sont pas les seules particules à fixer les hormones thyroïdiennes, les microsomes semblent même en accumuler davantage alors que la fraction nucléaire en retient moins (133,134). Nos résultats impliquent d'une part que la notion de concentration molaire hormonale ne reflète qu'imparfaitement l'influence exercée sur les oxydophosphorylations. Ce fait sera complété par les expériences du chapitre suivant, aussi apparaît-il nécessaire de tenir compte à la fois de la concentration en iodothyronine et de la quantité absolue de protéines du milieu réactionnel. D'autre part, comme il est fort probable que les iodothyronines ne se fixent pas uniquement sur les sites actifs, il est vraisemblable que la dose efficace est considérablement plus

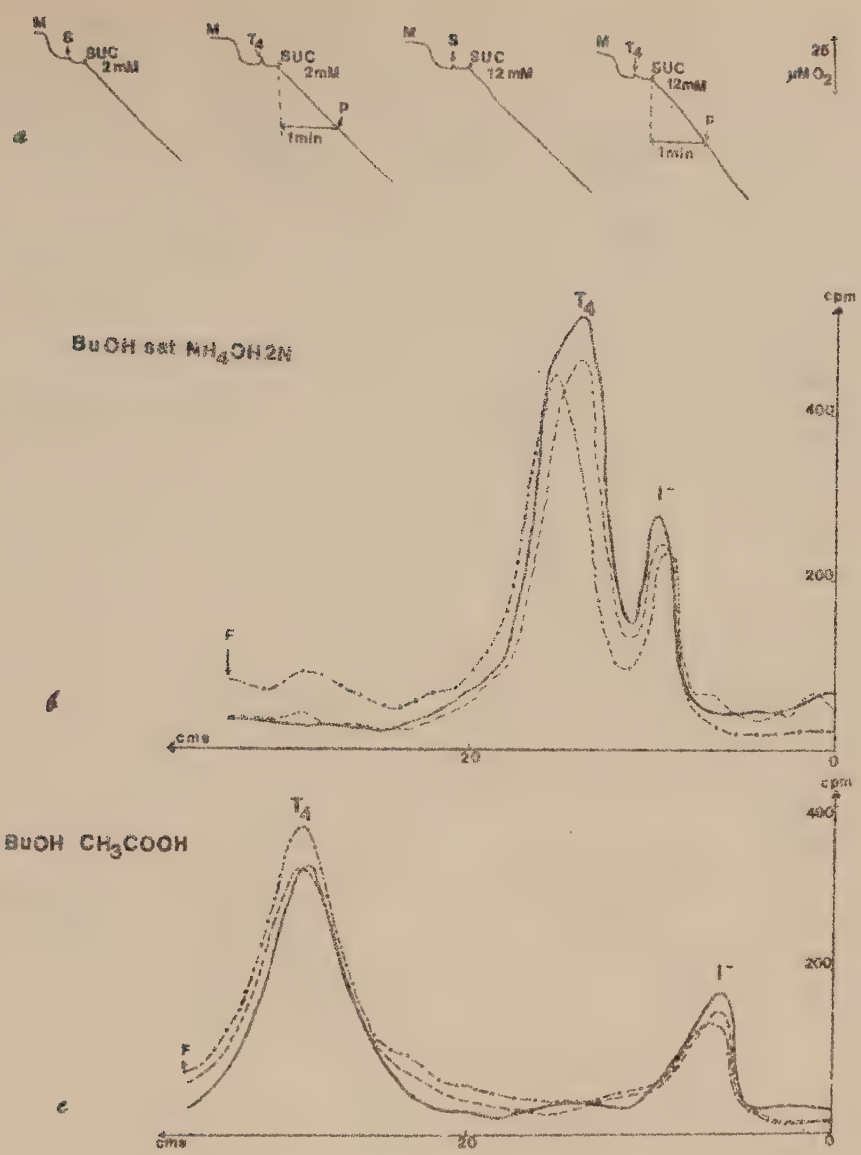


Figure I2 - Métabolisme de T_4 au cours de son action sur la respiration des mitochondries placées dans l'état 4 en présence de succinate.

a : enregistrements oxygraphiques (mêmes légendes que figure 9)

T_4 marqué = 50 µM stimulation respiratoire de 13p.100 avec Suc 2mM et de 33p.100 avec Suc 12mM

b : radiochromatogrammes en n.butanol saturé par NH_4OH 2N

c : radiochromatogrammes en n.butanol acétique (mêmes légendes que figure 9)

——— expérience témoin

– – – – T_4 marqué = 50 µM et succinate = 2mM

–·–·–·– même concentration de T_4 et succinate = 12mM

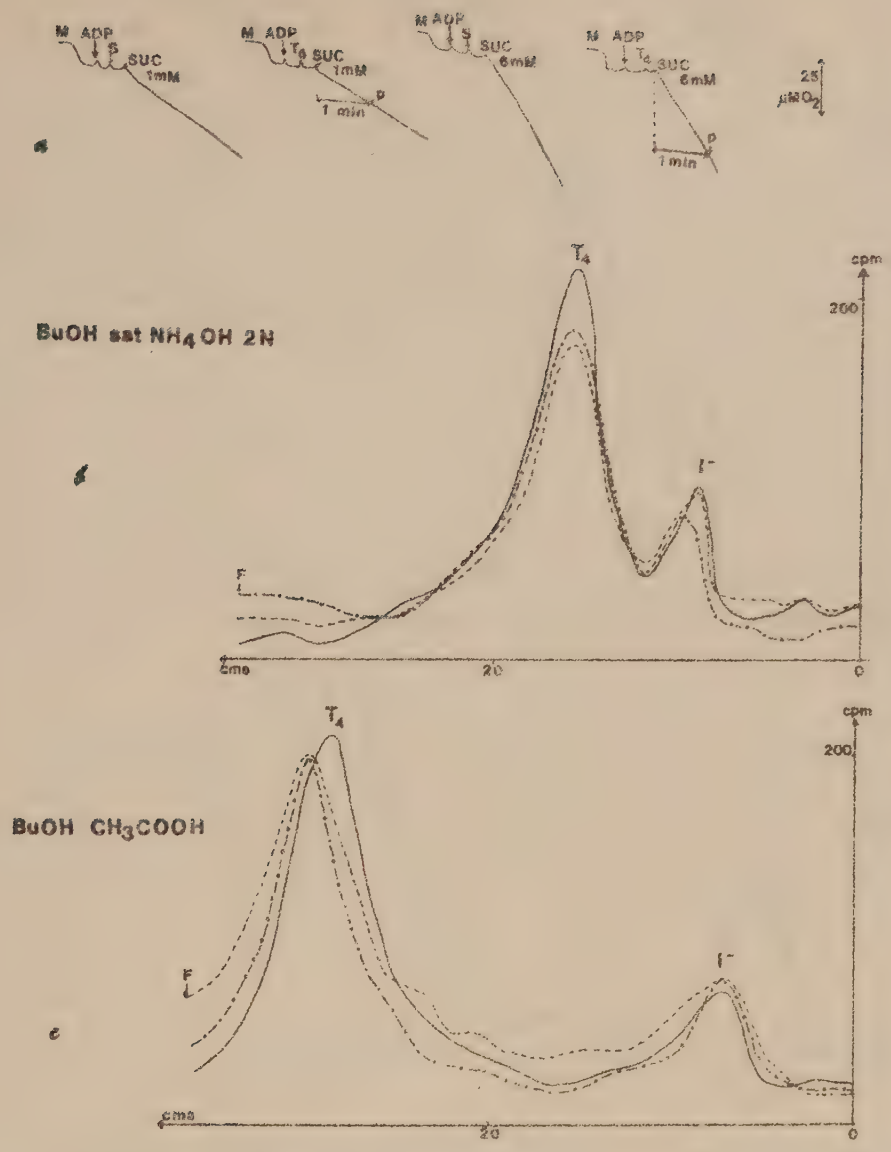


Figure I3 - Métabolisme de T_4 lors de son action sur une suspension de mitochondries respirant en état 3 en présence de succinate.

a : enregistrements oxygraphiques (mêmes légendes que figure 9)
ADP : 300 µM
T_4 marqué : 10 µM
en présence de succinate 1mM inhibition respiratoire de 25p.100;6mM inhibition respiratoire de 6p.100

b : radiochromatogrammes en n.butanol saturé par NH_4OH 2N

c : radiochromatogrammes en n.butanol acétique
(mêmes légendes que figure 9)

——— expérience témoin

----- T_4 marqué : 10 µM et succinate : 1 mM

-.-.- mêmes concentrations de T_4 et succinate 6 mM

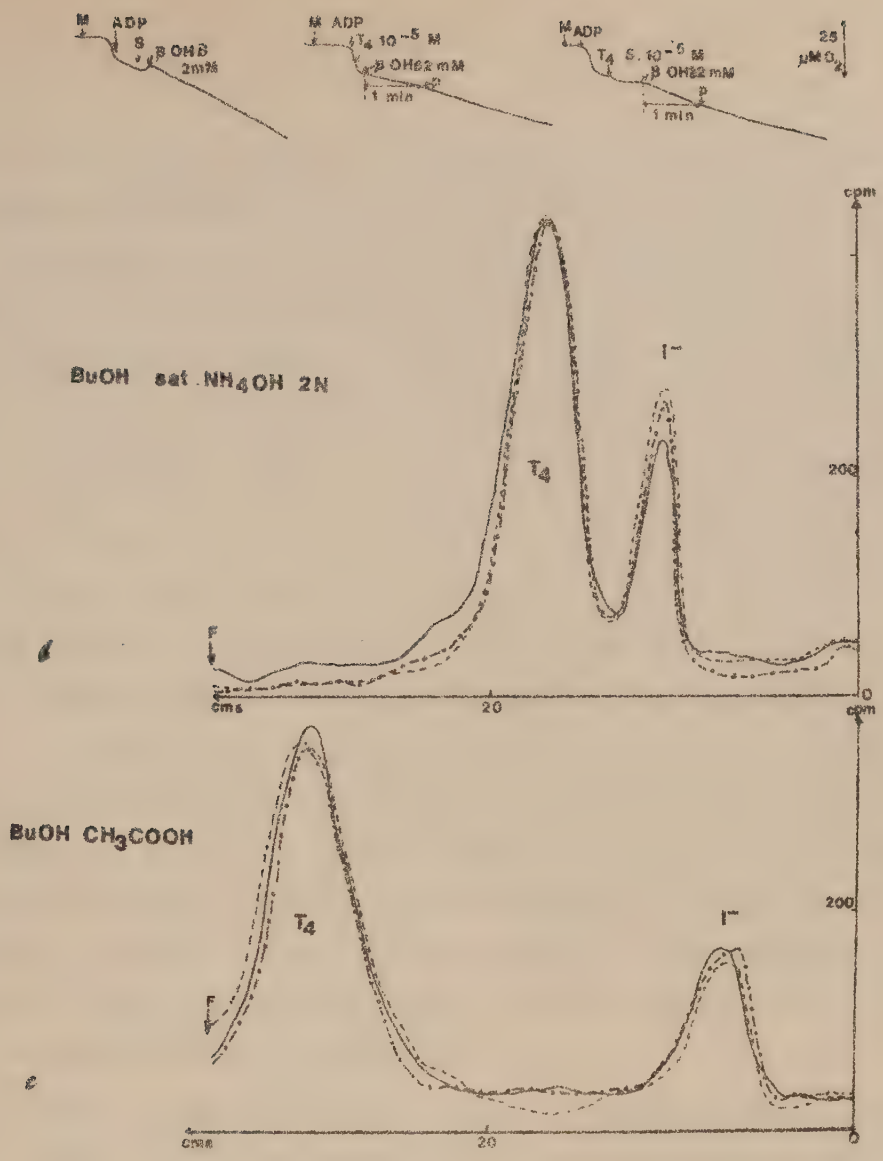


Figure I4 - Métabolisme de T_4 au cours de son action sur la respiration de mitochondries placées dans l'état 3 en présence de β hydroxybutyrate de sodium 2mM (β OHB).

a : enregistrements oxygraphiques (mêmes légendes que figure 9)

ADP = 300/uM

$T_4 + {}^*T_4$ = 10/uM inhibition respiratoire de 46p.100

50/uM " " 52p.100

b : radiochromatogramme en n.butanol saturé par NH_4OH 2N

c : radiochromatogramme en n.butanol acétique

——— expérience témoin

---- βOHB = 2mM et $T_4+{}^*T_4$ = 10/uM

-.-.- même concentration de βOHB mais $T_4+{}^*T_4$ = 50/uM

faible que celle mise en oeuvre au cours des essais in vitro. Il semble difficile d'expliquer l'action inhibitrice respiratoire des iodothyronines par un mécanisme semblable à celui qui a été proposé pour les phénols nitrés. L'inhibition de l'état 3 avec le dinitrophénol serait de type compétitif avec le substrat (135, 136). VAN DAM et SLATER (137,138) proposent que les découplants sont transportés dans la mitochondrie par les systèmes transporteurs localisés dans la membrane sous forme d'anions, ils pourraient ensuite, contrairement aux substrats, diffuser à l'extérieur sous forme non dissociée. Il y aurait ensuite donc compétition entre le découplant et les substrats pour leur passage au niveau membranaire et leur accumulation intramitochondriale.

Les effets des produits thyroïdiens variant avec la concentration en substrat, on pouvait penser que les mécanismes d'action des phénols iodés et nitrés étaient similaires. Cependant, les résultats obtenus par les expériences de pénétration semblent indiquer que les iodothyronines ont un comportement différent puisque leur accumulation dans la mitochondrie n'est pas fonction des concentrations en substrat.

Enfin, les expériences sur le métabolisme ne mettent pas en évidence de changement de structure des hormones thyroïdiennes lors de leur pénétration ou de leur action, il semble donc que le transport ne s'effectue pas sous forme anionique, une partie au moins de l'hormone doit cependant parvenir jusqu'à la matrice puisque les mesures de l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons qui font suite à ce chapitre montrent une action sur la chaîne respiratoire.

C H A P I T R E III

CINETIQUES D'ACTION DE DIVERS EFFECTEURS RESPIRATOIRES SUR L'ETAT D'OXYDOREDUCTION DES COENZYMES

L'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique qui est un métabolite de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine, influence la respiration des mitochondries au carrefour des déshydrogénases (139,93). Ces résultats n'ont pu être étendus jusqu'ici aux iodothyronines elles-mêmes. Or, puisque les oxydophosphorylations sont d'autant plus affectées par les produits thyroïdiens que la concentration en substrat est plus faible, de nouvelles études ont pu être entreprises avec la L-thyroxine et la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine.

I- Conditions expérimentales

Dans la plupart des expériences nous avons suivi parallèlement la vitesse de consommation d'oxygène des mitochondries grâce à l'électrode de CLARK et l'étude de l'état d'oxydoréduction des coenzymes avec le spectrophotomètre Aminco-CHANCE. La cuve renfermant l'électrode et celle du spectrophotomètre sont thermo-

statées à la même température de 25°C et leur volume est égal à 3 ml. Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux techniques cinétiques sans incubation préalable, c'est-à-dire qu'à la solution tamponnée nous ajoutons les mitochondries puis les différents réactifs en attendant après chaque addition d'avoir atteint l'état d'équilibre.

Nous avons étudié les deux voies : celle de la succino-dés--hydrogénase et celle de la NADH-déshydrogénase. Afin de ne pas être gêné par le retour du flux des électrons, nous ajoutons au tampon un inhibiteur de la voie succinique : le malonate (inhibiteur spécifique de la succinodéshydrogénase) quand le substrat est le β hydroxybutyrate et inversement de la roténone lorsque le substrat est du succinate (35,36). Les produits sont ajoutés à la microseringue et à chaque fois le mélange est homogénéisé à l'aide d'un agitateur à boules. Nous avons vérifié que cette opération ne redissout pratiquement pas d'oxygène.

La composition du tampon varie selon l'origine des mitochondries aussi sera-t-elle indiquée pour chaque manipulation.

II- Résultats expérimentaux

Les expériences sont réalisées sur des mitochondries de rat d'origine hépatique ou cardiaque. Nous commençons par les premières dont la durée de conservation est plus longue.

1) Mitochondries hépatiques de rat

Avant d'aborder l'action des iodothyronines dont l'effet est relativement complexe, nous rapporterons quelques résultats concernant l'action de divers effecteurs types des oxydophosphorylations.

Nous verrons principalement l'influence d'une part des inhibiteurs du transfert électronique et, d'autre part, des découplants classiques. Nous laisserons de côté les produits qui affectent la mise en réserve de l'énergie tels que l'oligomycine ou l'atractylate dont l'action est plus éloignée.

a) Inhibiteurs du transfert des électrons

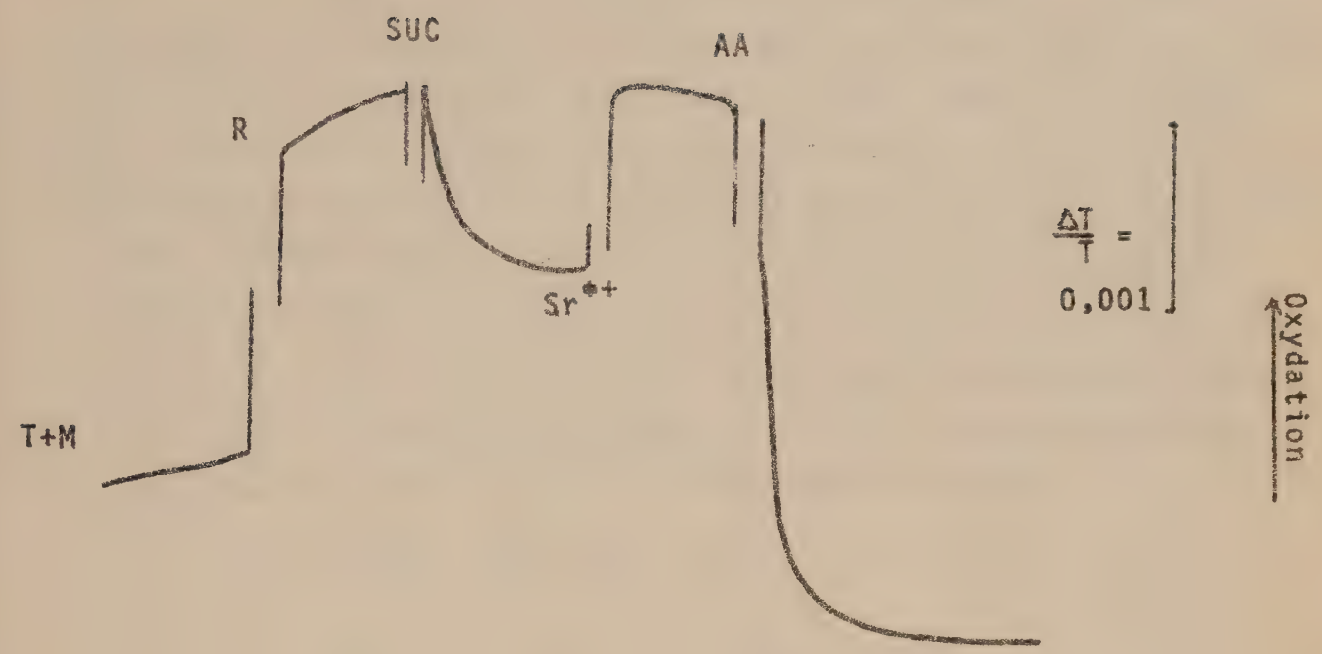
Le composé que nous avons utilisé en premier est l'Antimycine A qui est un complexe antibiotique formé d'au moins quatre produits de structure voisine, provenant de différents Streptomyces.

Sous l'action de ces inhibiteurs on a constaté la réduction de certains coenzymes et l'oxydation d'autres. Le point de séparation constitue ce que CHANCE a désigné sous le terme de "cross over point" (38). Le site d'inhibition de l'Antimycine A est localisé par de nombreux auteurs (140,38,141) entre le cytochrome b et le cytochrome c_1, il en résulte au niveau des coenzymes qu'en présence de mitochondries respirant avec de l'ADP, l'Antimycine A provoque une oxydation des cytochromes c_1,c a et a_3 et une réduction du cytochrome b, de l'ubiquinone et des flavoprotéines.

La figure 15 réalisée en présence de strontium qui agit comme découplant (voir plus loin page 82) met en évidence l'action de l'Antimycine A sur le transfert électronique.

L'expérience a été conduite en présence du tampon préconisé par CHANCE à partir de la voie succinique en présence de Roténone (R). Le strontium additionné sous forme de chlorure de strontium découple les oxydations des phosphorylations et cet effet se manifeste ici par une oxydation du cytochrome b et du cytochrome c_1 Ensuite l'Antimycine A (AA) provoque une réduction rapide et intense du cytochrome b (partie supérieure de la figure) tandis que le cytochrome c se trouve suroxydé (partie inférieure de la figure)

CYTOCHROME b



CYTOCHROME c

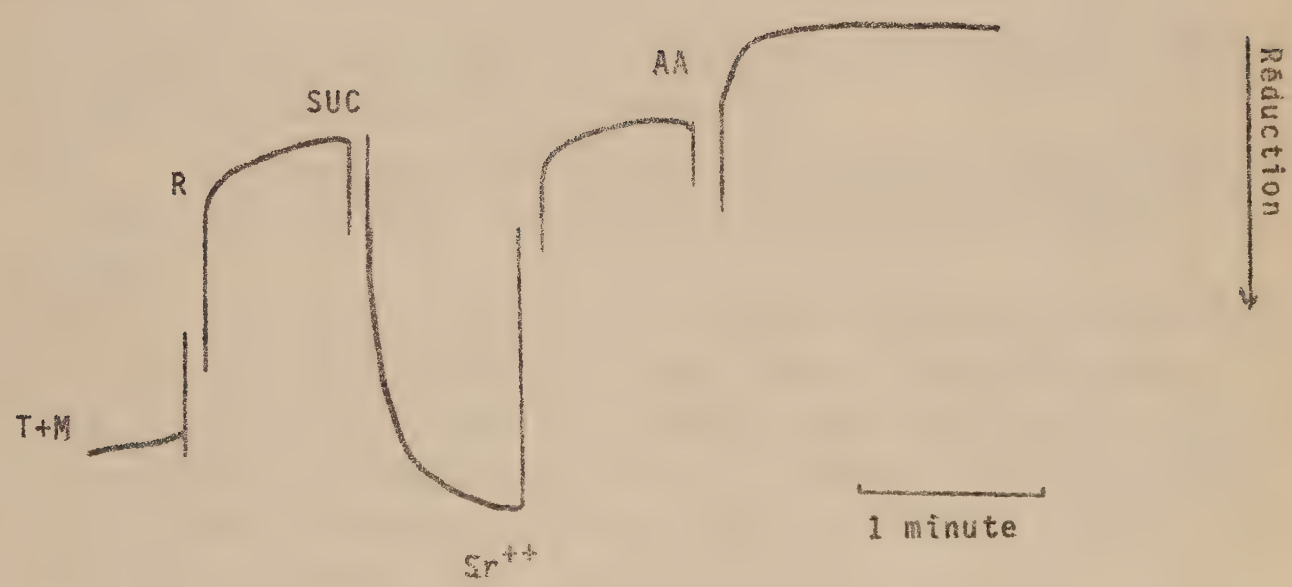


Figure 15 - Effet de l'Antimycine A sur l'état d'oxydoréduction du cyt b (564-575) et du cyt c (550-541) en présence de mitochondries respirant avec du strontium.

M = mitochondries 2,6 mg de protéines/ml
R = Roténone: 1,5 µM
Suc = succinate de sodium 2 mM
Sr^{++} = $SrCl_2$: 3,3mM
AA = 1,3 µg/ml
T = Tampon Chance

Il semble que l'inhibition par l'Antimycine A ne peut se manifester en présence d'un découplant que dans certaines limites de concentrations (142). En effet, on peut lever l'inhibition par addition de calcium ou de dinitrophénol, ce fait semblant montrer une action sur les réactions de conservation de l'énergie (143). Le mode d'action de l'Antimycine A a fait l'objet de récents travaux de SLATER (15,72) qui permettent de donner un schéma de l'effet de l'Antimycine A au niveau du 2ème site de phosphorylation. L'Antimycine A affecterait préférentiellement l'une des deux formes du cytochrome b (bi) présente en forte concentration dans les particules phosphorylantes.

La réaction finale est alors la suivante :

$$b^{2+} \sim x \; . \; bi^{2+} + x + \text{antimycine}$$

$$\rightleftharpoons b^{2+} \sim x \; (bi^{2+} \sim x).\text{antimycine}$$

La formation de ce complexe $bi^{2+} \sim x$ est à l'origine de l'apparition dans le spectre d'une bande rouge.

Le complexe $b^{2+} \sim x$ correspond à ce que CHANCE et WILLIAMS (38) appellent $b^{2+} \sim I$ et $bi^{2+} \sim x$ correspond au complexe $A \sim C$ (144).

L'inhibition par divers dérivés au niveau du site sensible à l'Antimycine A a été très utile : dans la détermination de la séquence des composants de la chaîne respiratoire (145), dans la reconstitution de celle-ci (146,147), dans la mise en évidence des sites de phosphorylation et dans le transport inversé des électrons (148,149).

b) Action de découplants types

Parmi les découplants, le plus typique est le 2,4 dinitrophénol qui stimule de façon maximum l'ATPase sans qu'il soit nécessaire d'ajouter des ions Mg^{++}.

Le 2,4-dinitrophénol (DNP) a été très utilisé par CHANCE (88,150) et VAN DAM (151) qui ont mis en évidence qu'une oxydation des coenzymes se produisait en sa présence. Au cours de ce chapitre, nous rapporterons les résultats obtenus avec le 2,4-dibromophénol (DBP) qui possède l'avantage de ne pas absorber dans le visible et qui possède néanmoins un comportement semblable à l'analogue nitré.

La figure 16 relate les effets du DBP sur la consommation d'oxygène de mitochondries (a) respirant en absence d'ADP et l'état d'oxydoréduction des flavoprotéines (b) et du cytochrome b (c). Nous avons rapporté en parallèle sur la partie droite de la figure les effets de l'ADP sur les mêmes mitochondries dans les mêmes conditions afin de pouvoir comparer leurs actions. L'expérience est réalisée en présence de tampon CHANCE avec de la roténone (R) afin d'explorer la voie succinique. On constate qu'une concentration de 82 uM de DBP provoque une accélération notable de la respiration puisqu'il stimule l'oxydation des flavoprotéines et du cytochrome b de façon plus importante que ne le fait l'ADP essayé comparativement.

Les figures 17 et 18 rapportent les actions du DBP sur les différents coenzymes de la chaîne respiratoire en présence de mitochondries placées en état 3, c'est-à-dire en présence d'ADP. Sur la partie supérieure (a) des deux figures, on note que la consommation d'oxygène est peu modifiée par l'addition de dibromophénol en état 3 : l'action du DBP est illustrée sur la partie droite des deux figures et doit être comparée à l'expérience témoin située sur la partie gauche et réalisée en présence du solvant de DBP (éthanol-H_2O 50/50 V/V) qui est d'ailleurs sans action. Au niveau des coenzymes on note pour tous une oxydation, le comportement des flavoprotéines et cytochrome b est représenté sur la figure 17 et les cytochromes c et aa_3 sur la figure 18

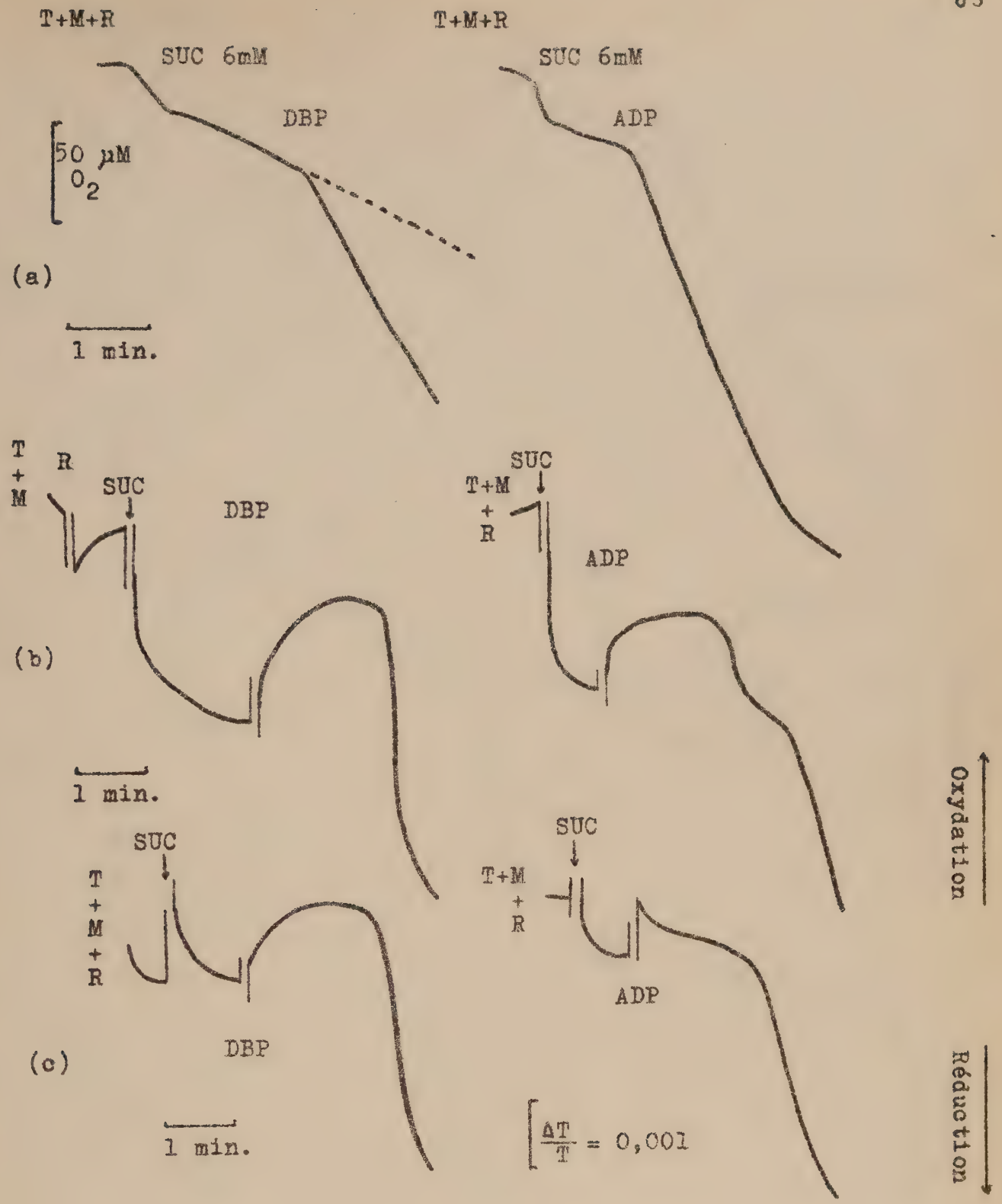


Figure 16 - Enregistrements montrant l'action du 2,4-dibromophénol (DBP) sur des mitochondries respirant en état 4.

(a) enregistrement oxygraphique
(b) variations de l'état redox des flavoprotéines (465-510 nm)
(c) variations de l'état redox du cytochrome b (564-575 nm)

T : tampon de CHANCE R : roténone 1,5 µM ADP : 0,6mM
M : mitochondries 2,2 mg de protéines/ml
SUC : succinate de sodium 6mM
DBP : 2,4-dibromophénol 82 µM

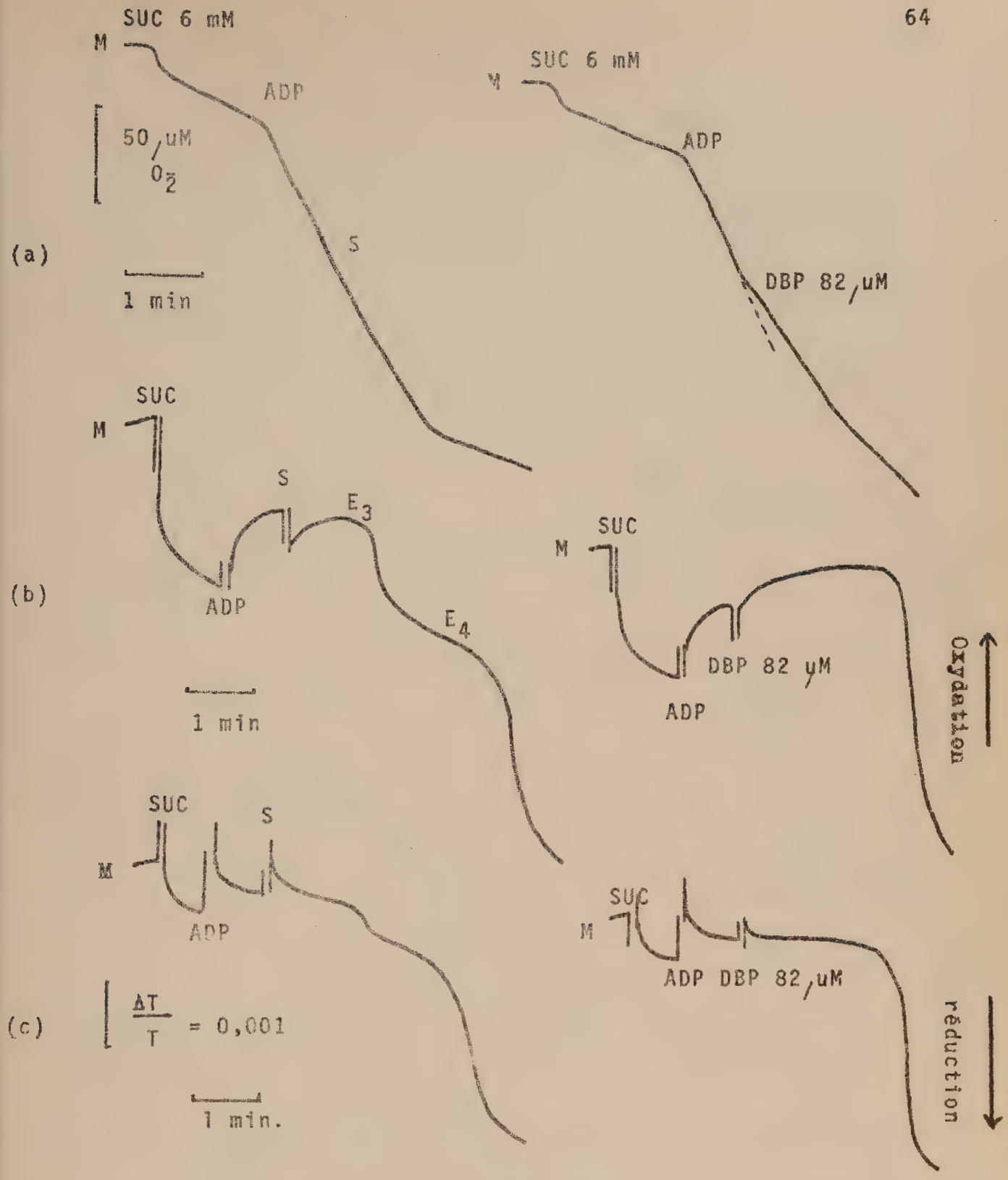


Figure 17 - Action du 2-4 dibromophénol sur la respiration (a) de mitochondries en état 3 et l'état d'oxydoréduction des flavoprotéines (b) (465-510) et du cytochrome b (c) (564-575).

tampon de CHANCE contenant de la roténone
M : mitochondries 2,4 mg de protéines/ml
SUC : succinate de sodium 6 mM
S : solvant du 2,4-dibromophénol ethanol-eau(50-50 v/v)
DBP : 2,4-dibromophénol
ADP : 0,75 mM

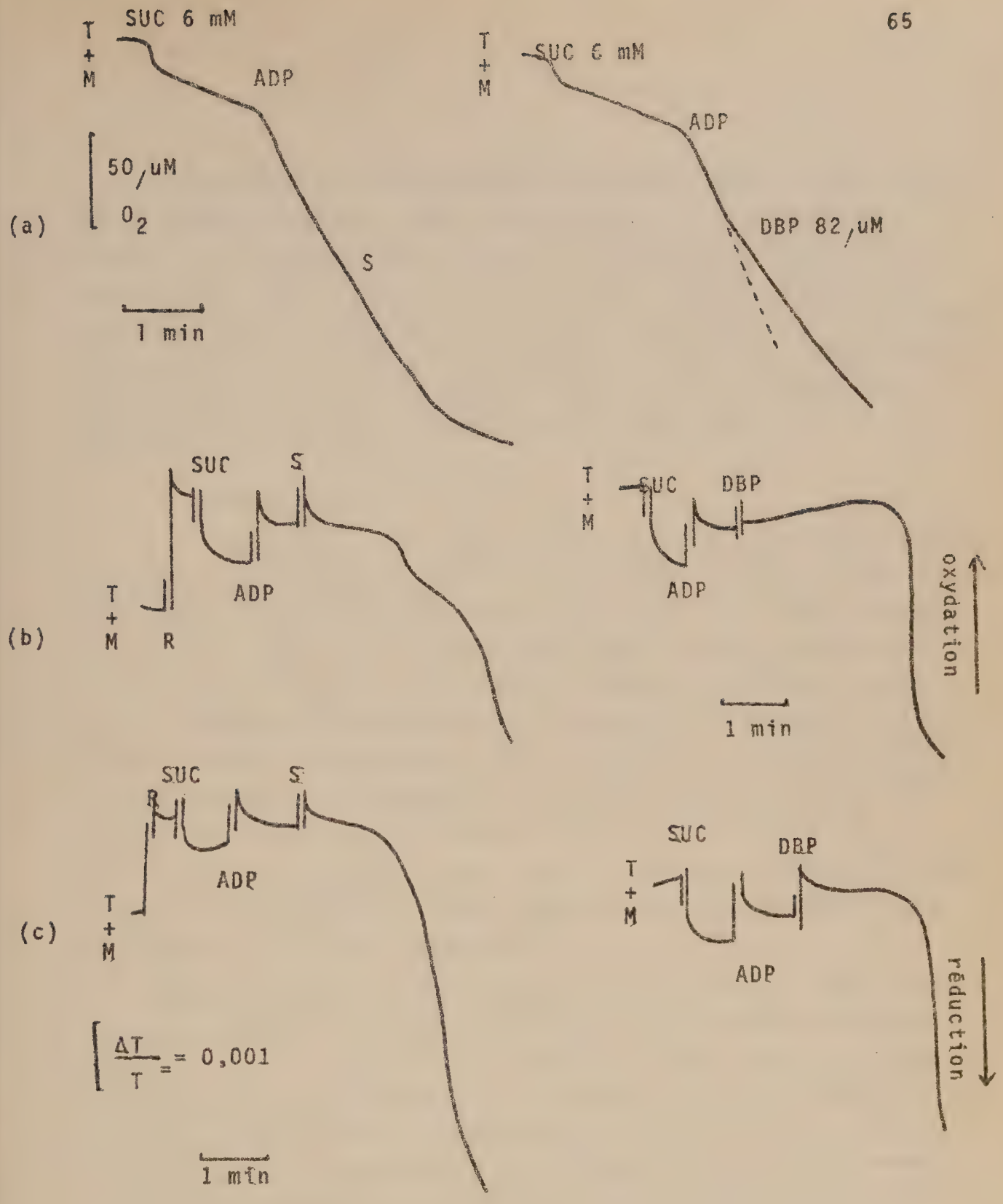


Figure I8 - Action du 2-4 dibromophénol sur la respiration (a) de mitochondries en état 3 et l'état d'oxydoréduction du cytochrome c (b) (540-550) et des cytochromes aa_3(c)(630-605) mêmes légendes que figure 16

L'oxydation se manifeste également au niveau du NAD à partir du β hydroxybutyrate comme substrat ainsi que le montre la figure 19 . 82 uM de DBP ralentit légèrement la respiration activée par l'ADP ce qui est visible sur l'enregistrement oxygraphique (a) de même que sur le tracé inférieur (b) du spectrophotomètre où le temps est légèrement allongé. Par rapport au témoin réalisé toujours avec son solvant (s) on constate que le DBP prolonge l'oxydation déjà produite par l'ADP.

X Discussion

En état 4 les découplants provoquent une activation importante de la respiration. A forte dose (en état 3) on observe une action inhibitrice. Ce double phénomène a pu être expliqué (50) par le fait que l'action découplante produit une hydrolyse d'un composé du type A $\sim$ I selon la théorie chimique ce qui a pour conséquence d'accélérer la consommation d'oxygène. A forte dose, l'excès de découplant (DNP) fixerait une grande partie de l'intermédiaire de couplage I le rendant indisponible au transporteur électronique et freinant ainsi la respiration.

L'effet des découplants a fait l'objet de nombreux travaux. WILSON et MERZ (152) exposent plusieursthéoriesmettant en jeu des actions au niveau membranaire.

HARRIS et coll. (153) évoquent la possibilité d'une inhibition du transport de l'ion potassium. Cette hypothèse est en relation avec la théorie de MITCHELL (49) qui explique le découplage par une augmentation de la perméabilité de la membrane aux protons, ce qui détruit le gradient H^+-OH^- éliminant ainsi la "force motrice" nécessaire à la synthèse d'ATP. Conjointement à cet effet, l'inhibition serait dûe à une compétition visà-vis du substrat dans le transport d'anions (137,90,135,154,155). Par ailleurs, l'inhibition directe d'une déshydrogénase par les découplants n'est pas exclue(132). Il semble en outre qu'il y ait

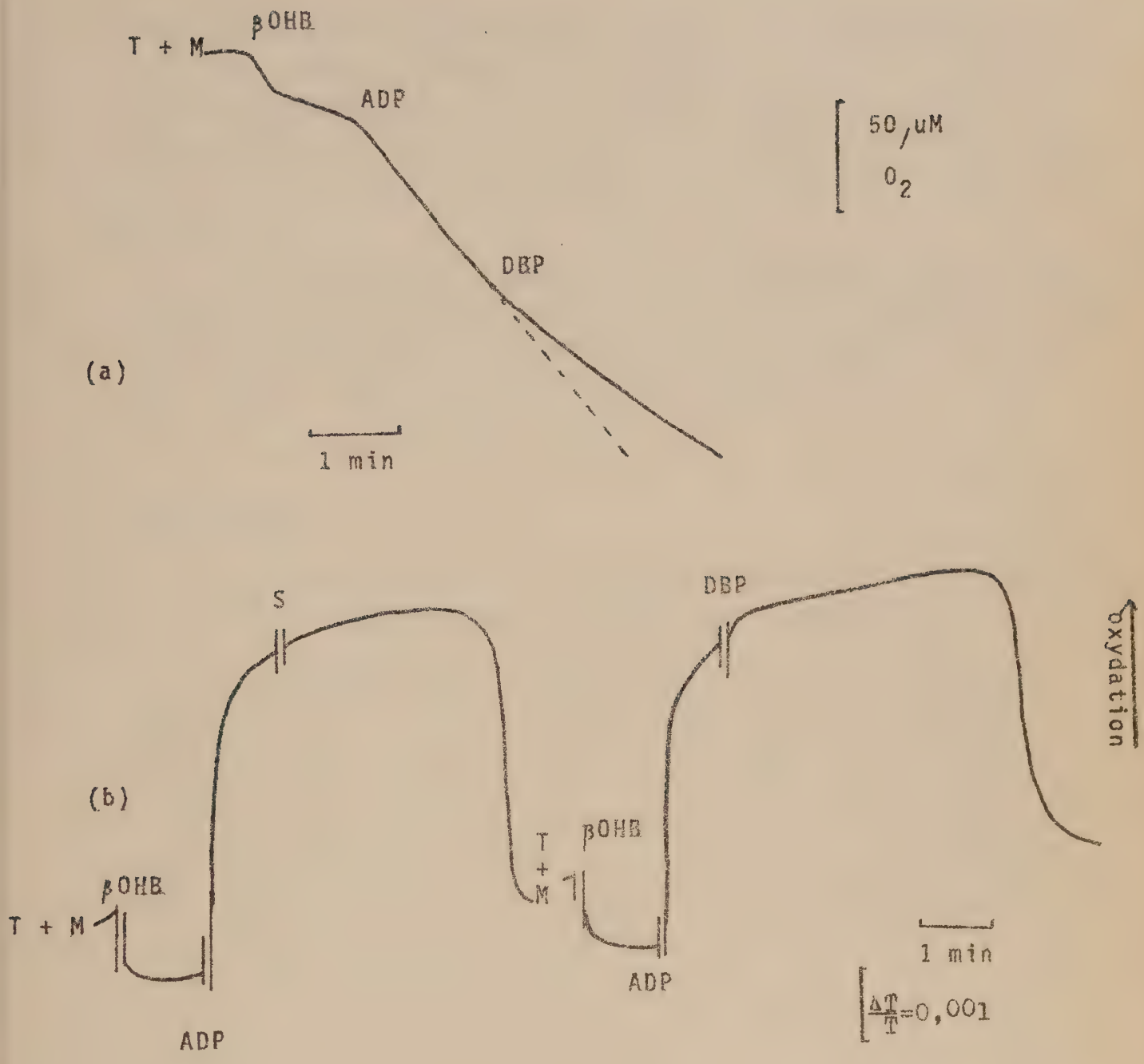


Figure I9 - Effet du 2-4 dibromophénol sur la respiration (a) de mitochondries hépatiques placées en état 3 et l'état d'oxydoréduction du NAD 350-388 nm.

S = solvant (éthanol-eau aa)
T = tampon Chance
DBP = 2,4 dibromophénol 82 µM
M = mitochondries 2,5 mg protéines/ml
βOHB = β hydroxybutyrate de sodium 2 mM
ADP = 0,9 mM

compétition vraie entre le découplage et la concentration d'ATP (156,157). Jusqu'à présent, il ne semblait pas que l'action du 2,4-dinitrophénol s'exerce préférentiellement sur un site de phosphorylation bien que récemment (158) on ait trouvé que le 1er et le 3ème site semblaient plus sensibles que le 2ème à son action.

Ces recherches entreprises sur les découplants et les hypothèses qui en découlent seront discutées dans le chapitre suivant car elles permettent d'éclairer le mode d'action des iodothyronines dont le compprtement est encore plus complexe.

c) Action des iodothyronines

Introduction

Nous avons étudié dans ce chapitre les effets des iodothyronines ou de leurs dérivés dans différentes conditions.

On a montré antérieurement (82,84) que la3,5,3'triiodo-L-thyronine et son dérivé acétique influencent les étapes de phosphorylation se manifestant par une libération de protons consécutive à l'inhibition de phosphorylation. Ce phénomène les rapproche donc des découplants. Il nous a paru intéressant de poursuivre l'étude sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes, étude déjà commencée avec l'acide triiodothyroacétique (93). Nous rapporterons ici les données obtenues avec la L-thyroxine (T_4) et la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3).

Résultats

Les essais entrepris en premier lieu portent sur l'influence de la L-thyroxine (T_4) sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires en présence de mitochondries respirant en état 4 c'est-à-dire en absence d'ADP. La figure 20 correspond à une expérience où le substrat est le succinate de sodium, la dose de thyroxine utilisée possède une légère action activatrice sur la respiration comme le révèle le tracé oxygraphique. Dans ces con-

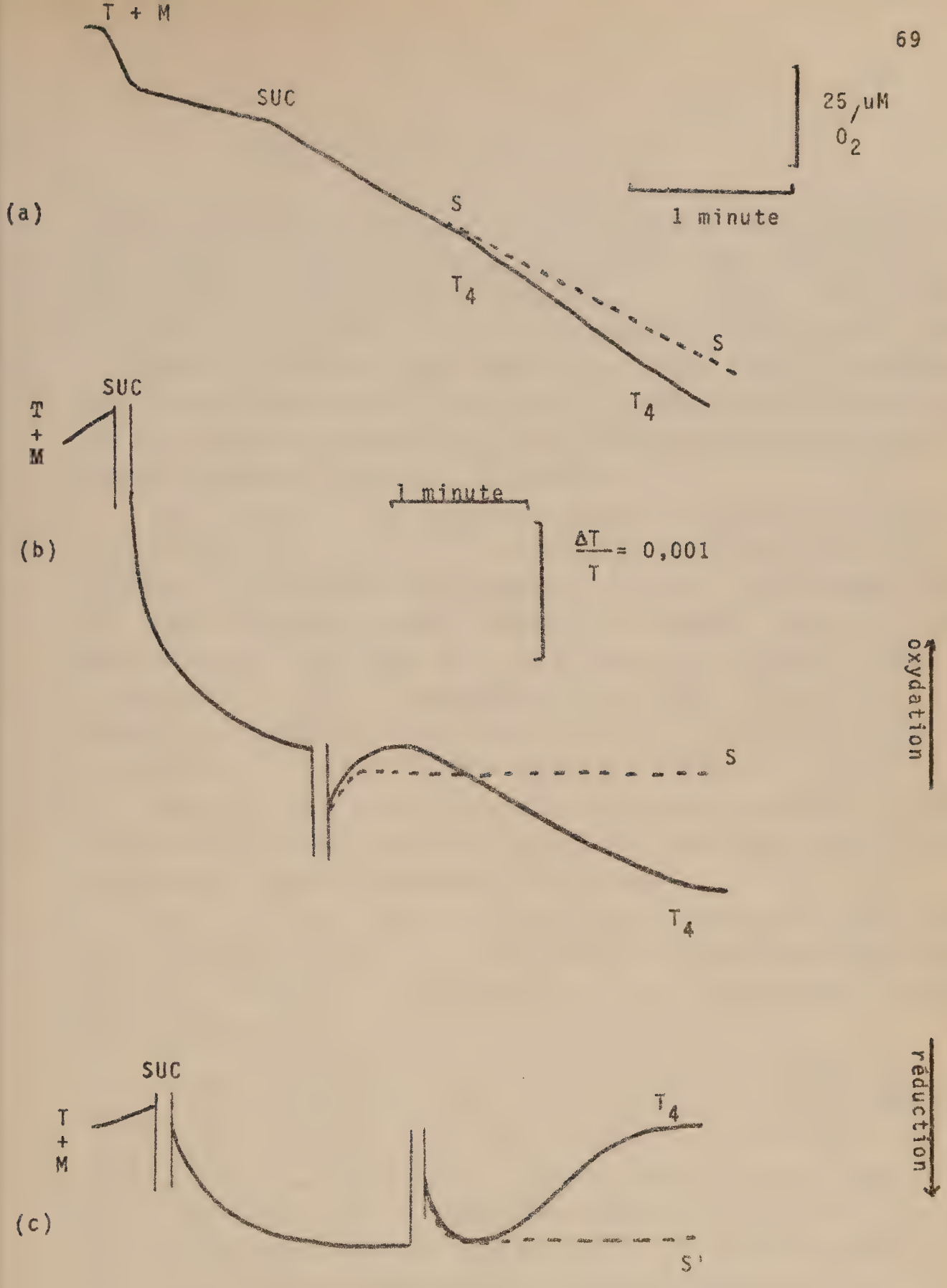


Figure 20 - Effet de la L-thyroxine sur la respiration (a) et l'état d'oxydoréduction des Flavoprotéines (b) 465-510 et cytochrome b (c) 564-575 de mitochondries placées en état 4 en présence de succinate.

T:tampon de CHANCE avec de la roténone
M:mitochondries 2,6 mg de protéines /ml
SUC:succinate de sodium 6 mM
T_4:L-thyroxine $1{,}15.10^{-4}$ M S:solvant de T_4(NaOH N/10-H_2O 25/75)

ditions, on note par rapport au témoin réalisé avec le solvant (S) qui a servi à solubiliser la thyroxine, une réduction nette des flavoprotéines tandis que le cytochrome b s'oxyde. La figure 21 suivante effectuée à partir du β hydroxybutyrate avec des doses de thyroxine voisines, nous montre sur l'état redox des coenzymes des effets analogues aux précédents. Le témoin est réalisé avec de la 3,5-diiodo-L-thyronine (T_2) de structure voisine mais pratiquement dépourvu d'activité biologique.

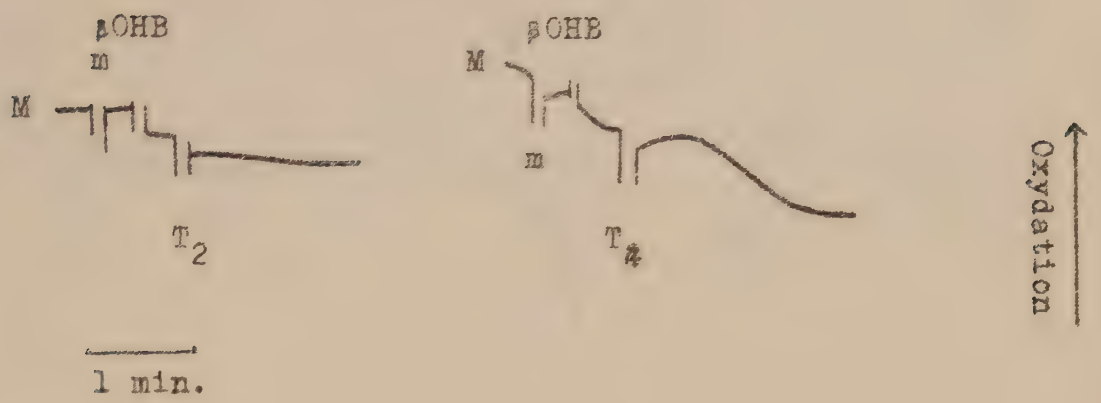
Par ailleurs, nous avons recherché l'action de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) et de la thyroxine sur l'état redox des coenzymes de mitochondries respirant en état 3, en présence d'ADP. Les doses d'iodothyronines provoquaient toujours une inhibition respiratoire. L'addition de T_3 en présence de succinate (Suc) (Figure 22) ou de β hydroxybutyrate (β OHB) (Figure 23) produit une réduction des flavoprotéines et une oxydation du cytochrome b. Il en va de même pour la L thyroxine (Figure 24).

Dans les deux états, il y a lieu de remarquer que la réponse hormonale n'est pas immédiate, elle ne se manifeste qu'après une période de latence inférieure à une minute.

Dans une autre série d'expériences, nous avons suivi l'effet de doses croissantes de T_4 d'une part sur l'état redox des flavoprotéines (Figure 25) et d'autre part sur les pyridines nucléotides (Figure 26).

La partie supérieure de la figure 25 rend compte des tracés oxygraphiques réalisés simultanément aux enregistrements spectrophotométriques reproduits sur la partie inférieure. Le premier essai se rapporte à un témoin effectué avec le solvant de T_4 additionné sous le même volume (NaOH N/10 : 1, eau : 3 - V/V) On constate que le succinate 2 mM réduit les flavoprotéines, ADP 0,75 mM, les oxyde tandis que le solvant n'apporte pas de modification. Dans les enregistrements qui suivent la L-thyroxine est ajoutée en état 3 à doses progressivement croissantes. T_4 33 µM qui inhibe la consommation d'oxygène de 40 p.cent ne produit pas

FLAVOPROTEINES (465-510 nm)



CYTOCHROME b (564-575 nm)

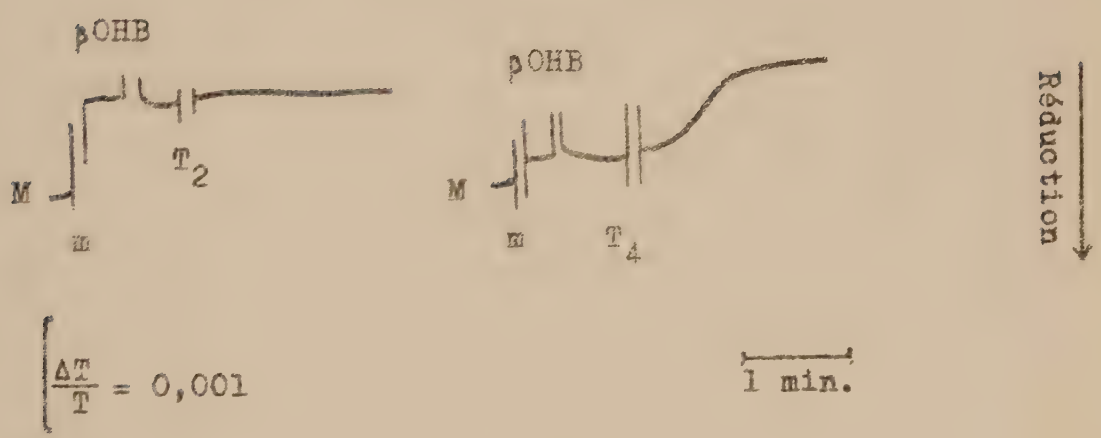


Figure 21 - Effet de la L-thyroxine sur l'état d'oxydoréduction des flavoprotéines et du cytochrome b de mitochondries respirant en état 4 en présence de β hydroxybutyrate.

M : mitochondries 3 mg de protéines/ml
m : malonate de sodium 2mM
βOHB : β hydroxybutyrate de sodium 2mM
T_2 ou T_4 : 10^{-4} M (flavoprotéines)
: $1,3.10^{-4}$ M (cytochrome b)
tampon de CHANCE

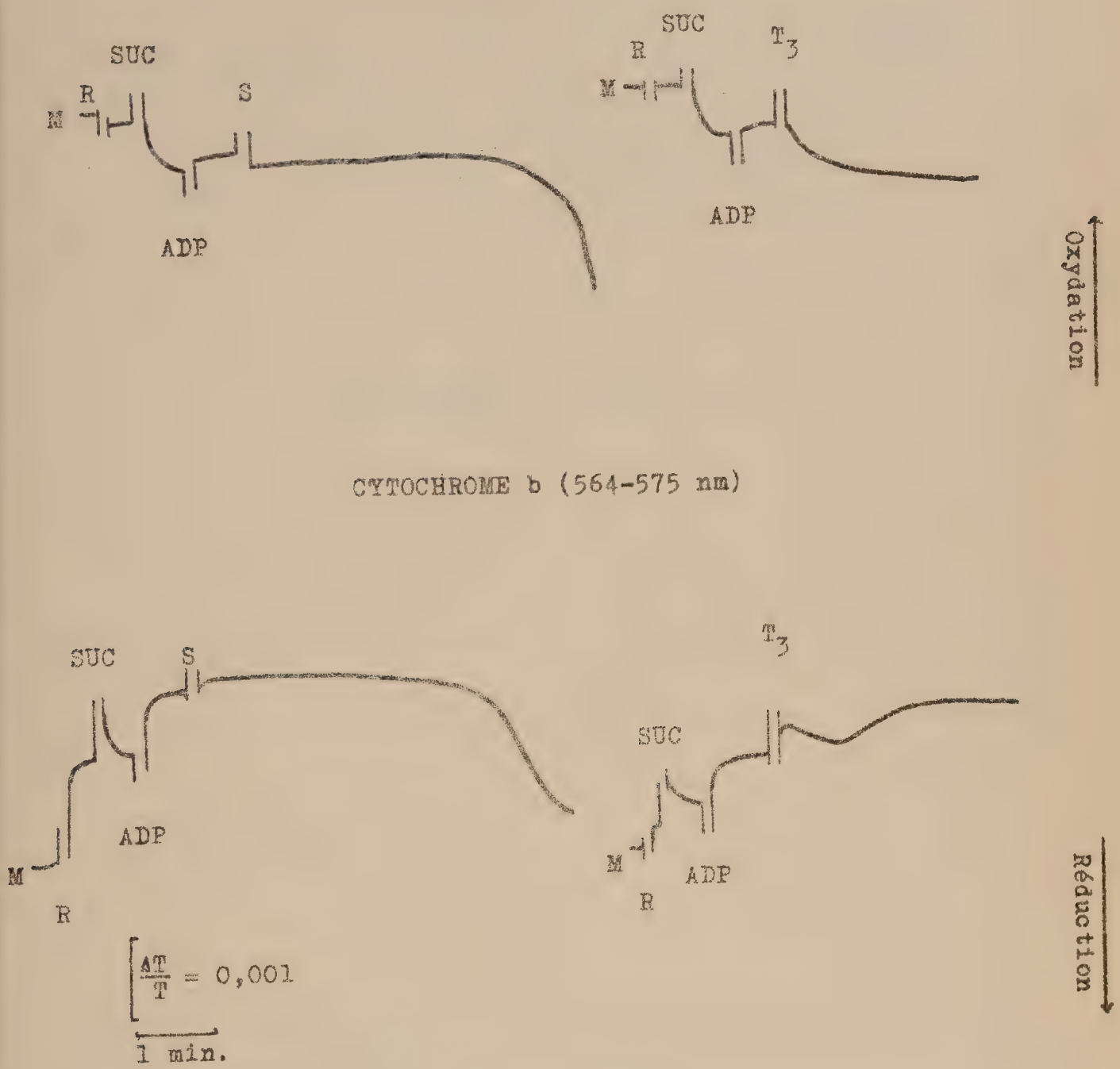


Figure 22 - Variations de l'état redox des flavoprotéines et du cytochrome b par addition de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) en état 3.

M : mitochondries 2,7 mg de protéines/ml de tampon de CHANCE
R : roténone 1,5 µM
SUC : succinate de sodium 2mM
ADP : 0,9 mM
S : solvant NaOH N/10-H_2O (30-70 v/V)
T_3 /: 0,1 µmole par mg de protéines

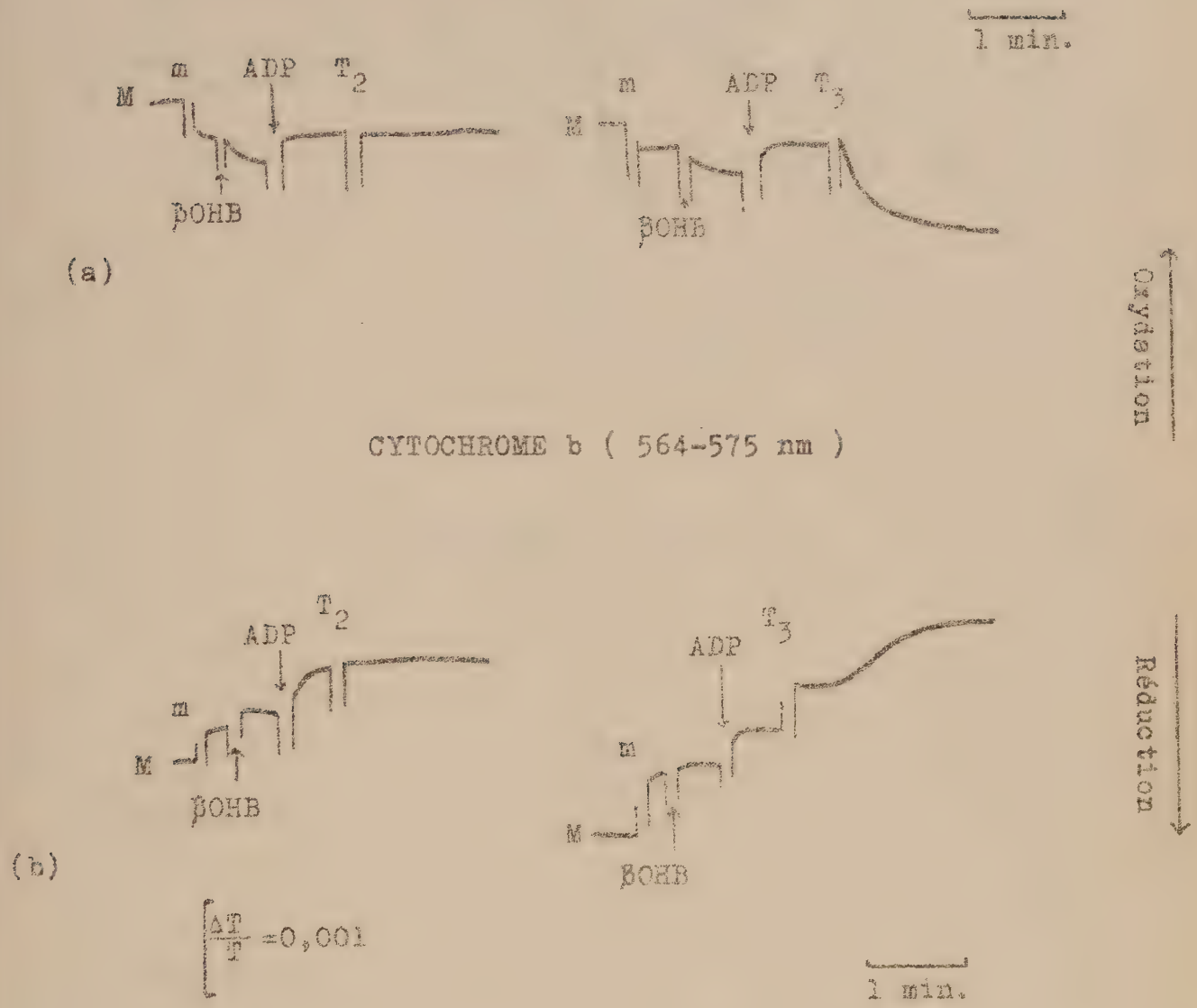


Figure 23 - Variations de l'état redox des flavoprotéines (a) et du cytochrome b (b) par addition de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) en état 3.

M : mitochondries 2,7 mg de protéines/ml

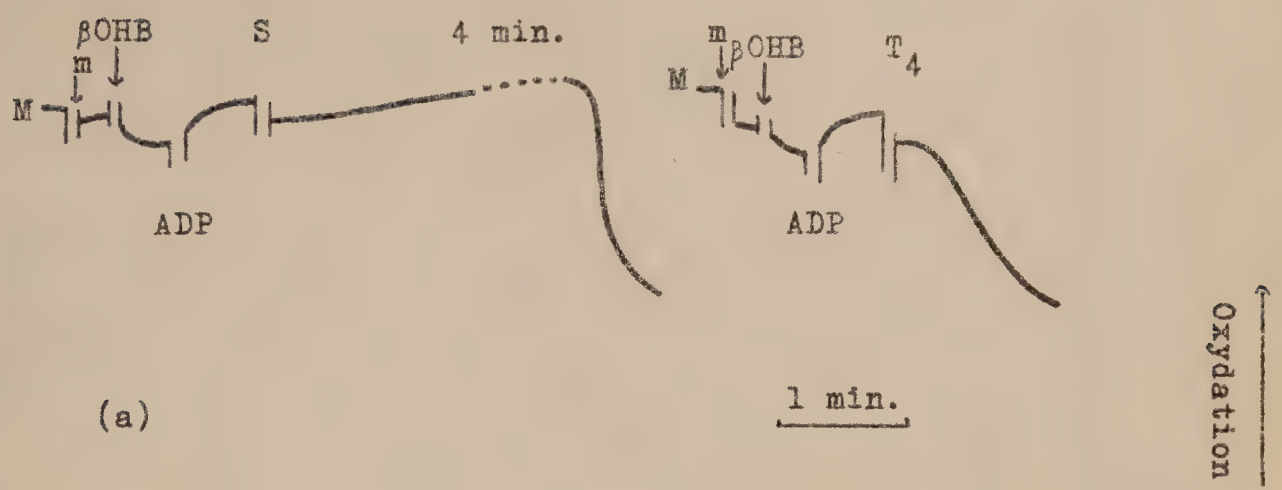
m : malonate de sodium 2mM

βOHB : β hydroxybutyrate de sodium 2mM

T_3 ou T_2 : 0,1 µmole/mg de protéine

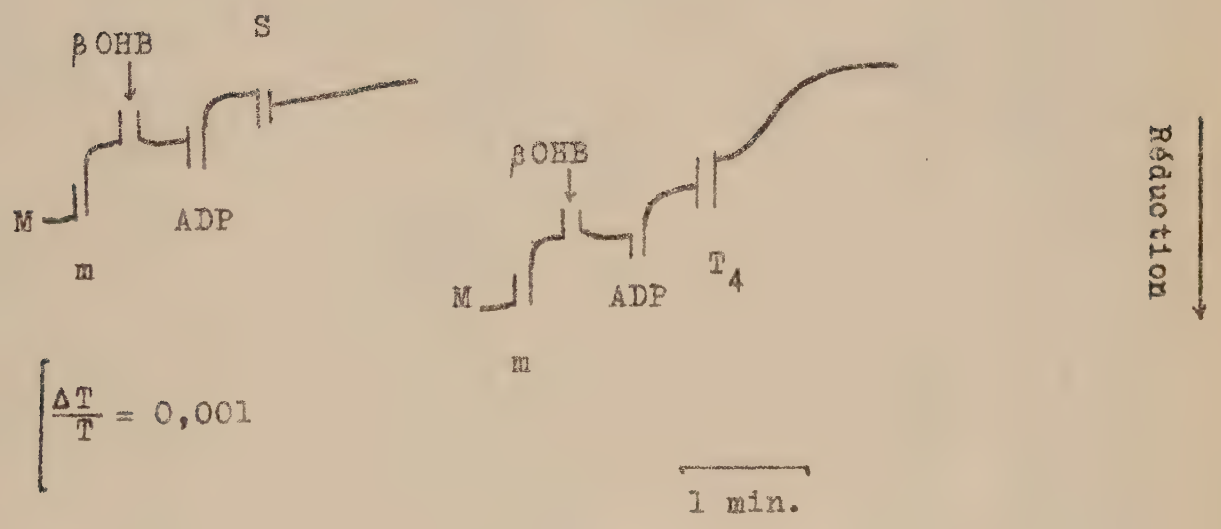
ADP : 0,9mM

FLAVOPROTEINES (465-510 nm)



(a)

CYTOCHROME b (564-575 nm)



(b)

Figure 24 - Variations de l'état redox des flavoprotéines (a) et du cytochrome b (b) par addition de L-thyroxine (T_4) en état 3.

M : mitochondries 2,7 mg de protéines/ml dans du tampon de CHANCE
m : malonate de sodium 2mM
βOHB : β hydroxybutyrate de sodium 2mM
ADP : 0,9mM
S : solvant NaOH N/10-H_2O (25-75 v/v)
T_4 :35 nmoles par mg de protéines

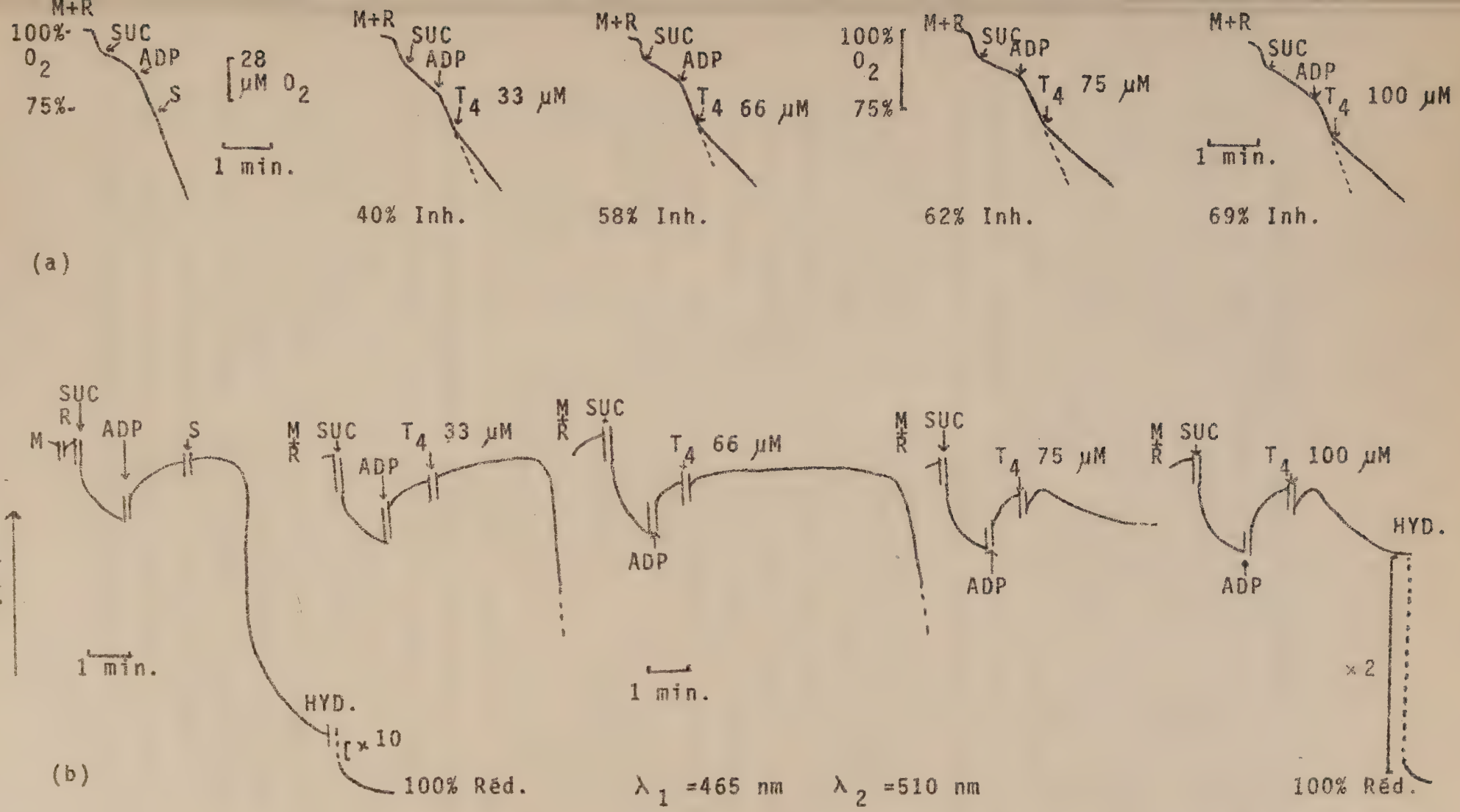


Figure 25 _ Influence de la thyroxine sur la respiration (a) et la réduction des flavoprotéines (b) des mitochondries respirant en état 3 en présence de succinate.

M : mitochondries 2,8 mg de protéines par ml
R : roténone 1,5 µM
SUC : succinate de sodium 2 mM
ADP : $7{,}5.10^{-4}$ M
Inh : inhibition respiratoire
HYD : hydrosulfite de sodium

de réduction significative des flavoprotéines. On constate seulement un allongement du temps avant l'arrivée à l'anoxie. Avec une concentration en T_4 de 66/uM inhibant la respiration de 58 p.cent un plateau apparaît. Mais c'est seulement à partir d'une concentration de 75/uM en thyroxine qu'une réduction des flavoprotéines se manifeste pour une inhibition respiratoire de 62 p.cent. Pour des doses plus élevées : 100/uM de T_4 qui inhibe la consommation d'oxygène de 69 p.cent, le taux de réduction des flavoprotéines augmente. On remarquera sur ces tracés que cette réduction s'opère toujours avec un temps de latence inférieur à une minute.

Sur la figure 26 nous explorons la voie de la NADH déshydrogénase à partir du β hydroxybutyrate (β OHB). L'effet de doses croissantes de T_4 provoque sur l'état redox du NAD une réduction croissante. Cette étude rapportée sur la courbe de la figure 27 montre qu'il existe un seuil, qui est de 70/uM de T_4, à partir duquel l'effet de la thyroxine se manifeste sur la réduction du NAD, ensuite le taux de réduction augmente progressivement pour les doses de T_4 comprises entre 70 et 116/uM puis varie brusquement entre 116 et 140/uM de T_4. On atteint ensuite un plateau, c'est-à-dire que des additions de thyroxine ne provoquent plus de réduction supplémentaire du NAD. Ce résultat nous montre que les limites de concentration entre lesquelles l'effet de la thyroxine se manifeste sont assez étroites. Il s'ensuit que les conditions expérimentales ont une influence certaine et que l'état fonctionnel des mitochondries importe aussi.

Nous avons par ailleurs rassemblé dans le tableau IX des résultats concernant le taux de réduction du NAD par des doses variables de thyroxine sur diverses préparations mitochondriales en état 3 et en présence de β hydroxybutyrate comme substrat. Nous avons porté les volumes sous lesquels la thyroxine est ajoutée en/ul, la concentration finale en/uM est indiquée par ordre croissant. Dans la troisième colonne nous avons rapporté la quantité de L-thyroxine au mg de protéines mitochondriales. Le résultat du

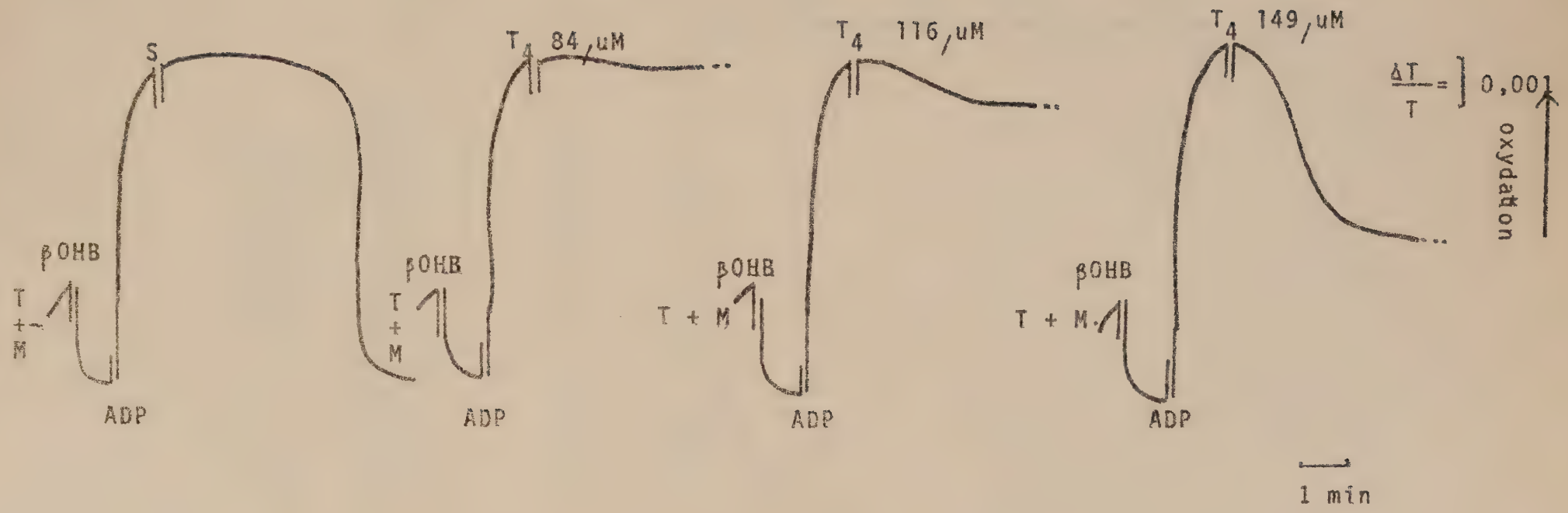


Figure 26 - Effet de doses croissantes de L-thyroxine (T_4) sur l'état Redox des pyridine-nucléotides en état 3 NAD (350-388nm)

M = mitochondries (2,4 mg/ml)
βOHB = β hydroxybutyrate de sodium 2mM
ADP = 0,9 mM
S = Solvant de la thyroxine (NaOH N/10 - H_2O (25-75 V/V)
T_4= L-thyroxine

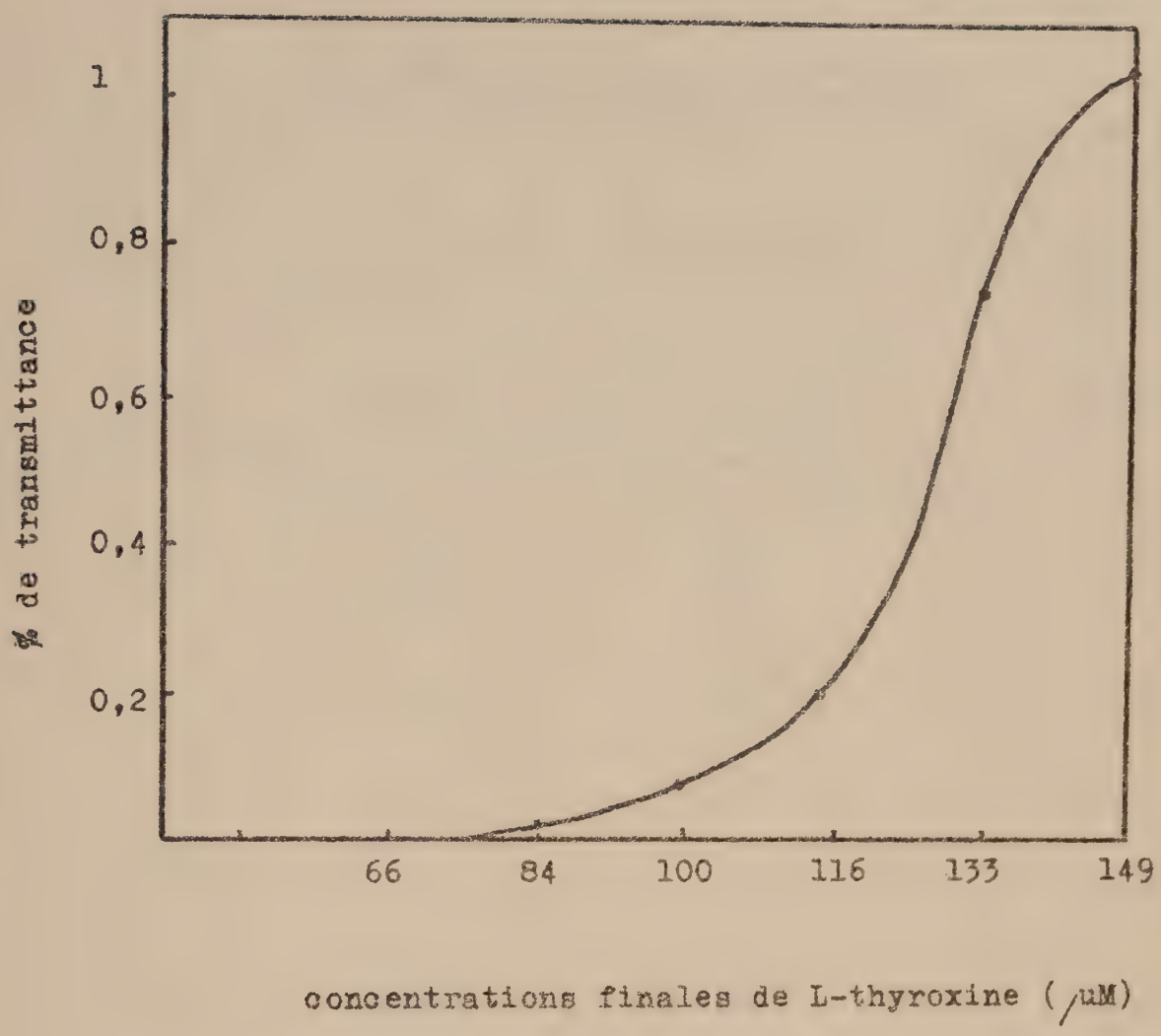


Figure 27- Effet de doses croissantes de L-thyroxine sur la réduction du NAD en présence de mitochondries respirant en état 3 et avec le β hydroxybutyrate de sodium comme substrat.

tampon CHANCE
mitochondries : 2,4 mg de protéines par ml
ADP: 0,9 mM

TABLEAU IX

Réduction des pyridines nucléotides
par des doses variables de thyroxine
sur des mitochondries respirant en état 3 en présence de β OHB

VOLUME de T_4 (μl)	CONCENTRATION finale de T_4 (μM)	CONCENTRATION de T_4 mμ moles / mg protéines	TAUX de REDUCTIO du NAD % $\frac{\Delta T}{T}$
20	66	55	0,34
25	84	35	0,02
30	100	41	0,07
		57	0,50
35	116	48	0,20
40	133	55	0,70
		83	1,45
45	149	62	1,00
		78	1,10

taux de réduction du NAD exprimé en pourcentage de transmittance nous montre clairement que celui-ci croît en premier lieu avec la concentration en iodophénol rapportée au mg de protéines. C'est pour cette raison que nous avons souvent indiqué la concentration de thyroxine rapportée à la quantité de mitochondries. En fait, il faut tenir compte aussi de l'état fonctionnel des particules, c'est pourquoi la concentration finale joue aussi son rôle.

Connaissant l'action du 2,4-dibromophénol (DBP) sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes nous l'avons utilisé après l'action de la L-thyroxine (Figure 28).

Nous avons enregistré la respiration des mitochondries (a) : la dose de L-thyroxine 160 µM inhibe fortement la consommation d'oxygène et réduit très fortement le NAD (Figure 28). Si on ajoute alors du DBP à la dose de 100 µM on constate qu'il est encore capable d'oxyder le NAD. On ne remarque pas de modification de la respiration déjà fortement inhibée par T_4.

Discussion

Les iodothyronines ajoutées à des mitochondries placées dans un état respiratoire stable, modifient le niveau redox des transporteurs puisqu'elles provoquent l'oxydation du cytochrome b et la réduction des flavoprotéines. Ces réponses ont lieu quand les particules se trouvent soit dans l'état contrôlé, soit dans l'état activé par l'ADP . Ces expériences mettent ainsi en évidence une action directe des phénols iodés sur la chaîne respiratoire et déterminent un "cross over point" au carrefour des déshydrogénases, sans doute dans la région de l'ubiquinone.

Nos essais montrent donc pour les iodothyronines un comportement analogue à celui de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique mais alors que le dérivé acétique intervient même avec des concentrations élevées de substrat (93), les phénols iodés ne manifestent un effet décelable sur l'oxydoréduction des coenzymes qu'avec des concentrations relativement faibles en substrat.

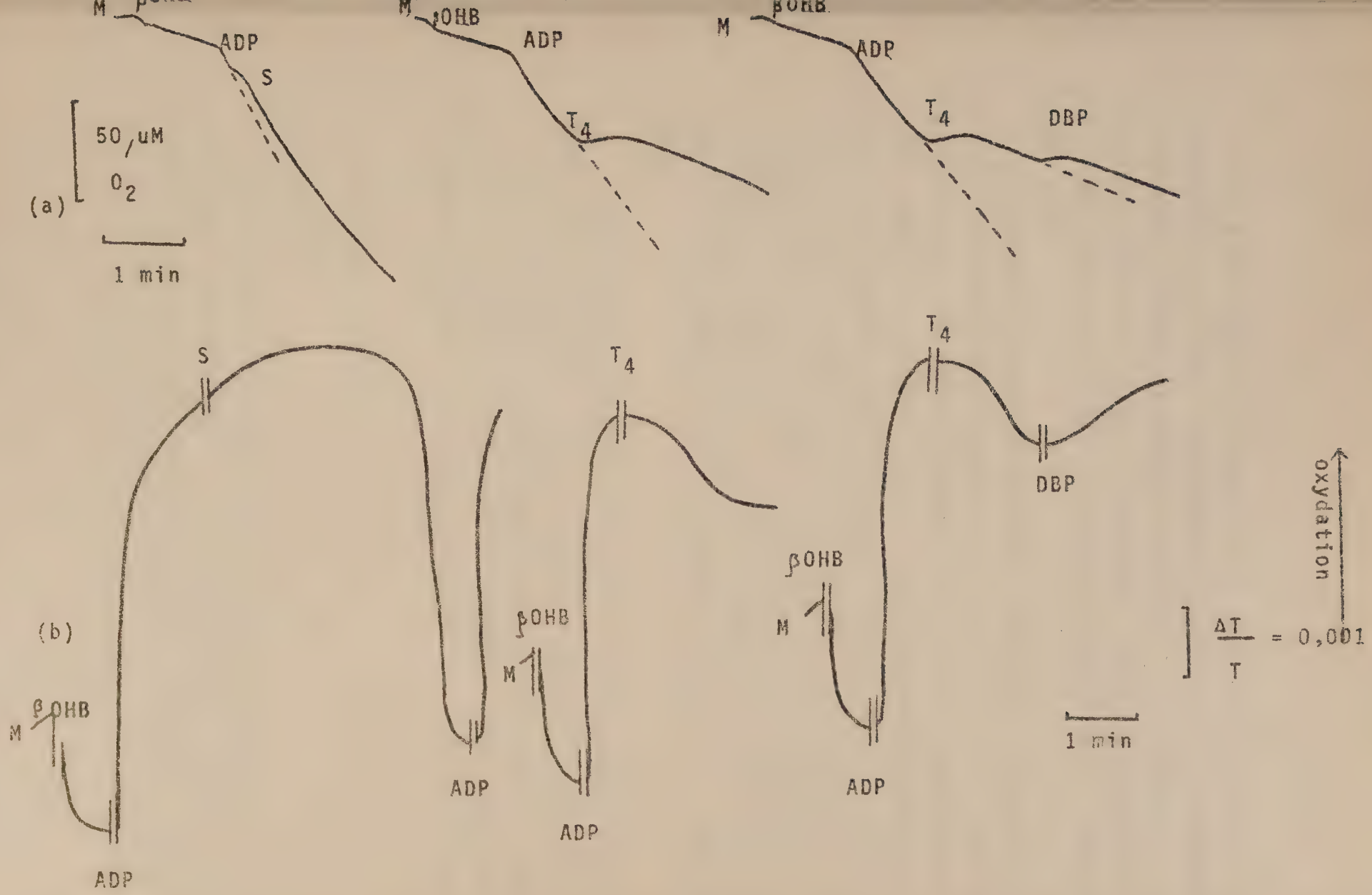


Figure 28 - Effet de la L-thyroxine et du 2.4 dibromophénol sur la respiration (a) et l'état d'oxydo-réduction du NAD (b) (350-388nm)

M = mitochondries 2,5 mg/ml
βOHB = β hydroxybutyrate 2mM
ADP = 0,9mM
T_4 = 160 µM
DBP = 2,4 dibromophénol (100/uM)

On a été tenté de comparer les produits thyroïdiens aux découplants car leur comportement vis-à-vis de la consommation d'oxygène est qualitativement semblable : activation de l'état 4 et inhibition de l'état 3. Cependant l'effet inhibiteur du DNP en état 3 se traduit par une oxydation de tous les coenzymes (88, 150, 151).

Toutefois, comme la dernière partie de ce chapitre montre que la réduction des flavoprotéines ou du NAD ne se manifeste qu'à partir d'un certain degré d'inhibition respiratoire, il ne semble pas que cet effet puisse s'expliquer uniquement par une action des hormones au niveau des transporteurs du flux électronique. Ainsi les phénols iodés affectent de deux façons opposées la consommation d'oxygène : l'une activatrice située au niveau des étapes de transfert ou de couplage qui est oxydante, l'autre inhibitrice se manifestant par l'arrêt du flux des électrons en amont du cytochrome b dans la région occupée par l'ubiquinone (102).

Plusieurs faits font penser que les deux phénomènes sont sans doute simultanés mais autonomes et antagonistes. D'une part l'effet découplant n'apparaît pas en premier puisque l'on n'observe qu'une réduction des flavoprotéines sans oxydation même passagère de celles-ci. D'autre part, l'addition des iodothyronines ne provoque qu'une réduction partielle des flavoprotéines.

d) Cations divalents

Introduction

Les cations divalents ont une double influence sur les fonctions mitochondriales. Ils se comportent en agent découplant d'une part, et agissent en accepteur de phosphate, d'autre part. Par ailleurs, nous venons de voir que les iodothyronines affectent les étapes de conservation d'énergie, il est donc intéressant

d'étudier l'effet des produits iodés en présence de cations divalents afin de localiser mieux le lieu où elles exercent leur action. De plus, comme on a montré que le cation empêche le gonflement spontané des mitochondries et s'oppose à la fixation active de l'eau par T_4 (159), on peut penser que les particules ne doivent pas être lésées, d'ailleurs leur consommation d'oxygène n'est pas affectée de façon irréversible.

Résultats

Au cours de cette étude nous avons fait appel au strontium additionné sous forme de chlorure. : cet ion divalent possède les mêmes propriétés que le calcium en ce qui concerne les oxydophosphorylations mais présente l'avantage de ne pas léser les membranes. L'effet de Sr^{++} se traduit par une oxydation de tous les transporteurs, elle persiste tant que dure la captation du cation en sorte qu'à chaque addition correspond une flambée oxydante.

La figure 29 donnée à titre d'exemple illustre ce fait. On constate qu'en présence de strontium 1.500/uM la respiration est fortement activée, parallèlement le NAD subit une forte oxydation qui dure jusqu'à ce que tout Sr^{++} soit capté. Sur la partir de droite de la figure, on observe que la L-thyroxine (160/uM) ajoutée après le strontium inhibe la respiration activée par celui-ci et provoque une importante réduction du NAD. L'addition postérieure de dibromophénol (DBP) est alors sans effet.

Les figures 30 et 31 données à titre d'exemple, montrent que la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine comme la L-thyroxine empêche l'oxydation des flavoprotéines provoquée par le cation et que le cytochrome b subit une suroxydation. Ainsi le comportement de ces deux substances T_4 et T_3 sur l'état redox des coenzymes est le même que la respiration soit activée par Sr^{++} ou l'ADP.

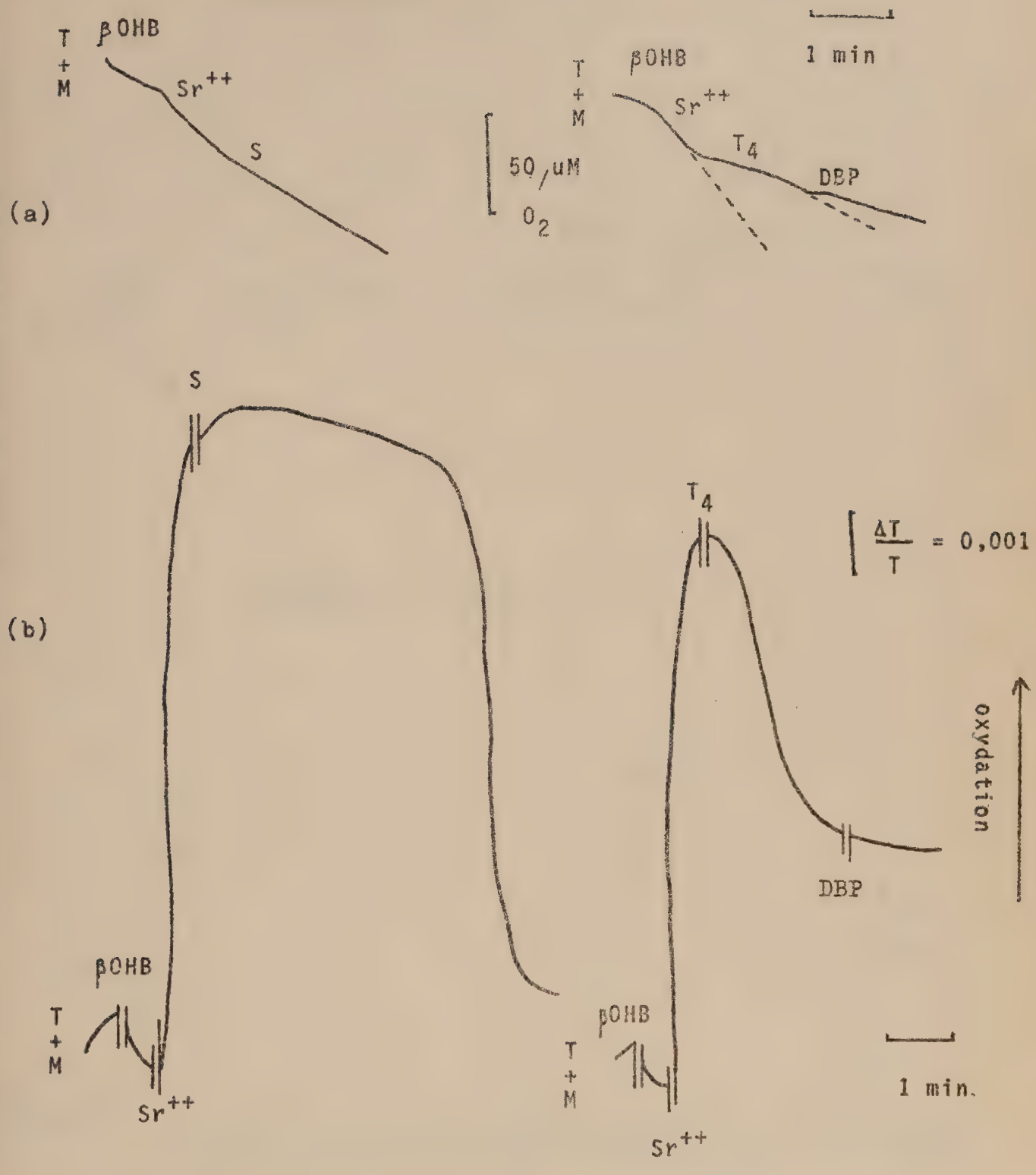


Figure 29 - Effet de la L-thyroxine sur la respiration (a) de mitochondries hépatiques en présence de Strontium et sur l'état Redox du NAD (350-388nm) (b).

T = Tampon phosphate-KCl
M = mitochondries 2,7 mg protéines/ml
Sr^{++}=$SrCl_2$ 1500 µM βOHB = βhydroxybutyrate 2 mM
DBP = 2,4-dibromophénol 100 µM
T_4 = L-thyroxine 160 µM

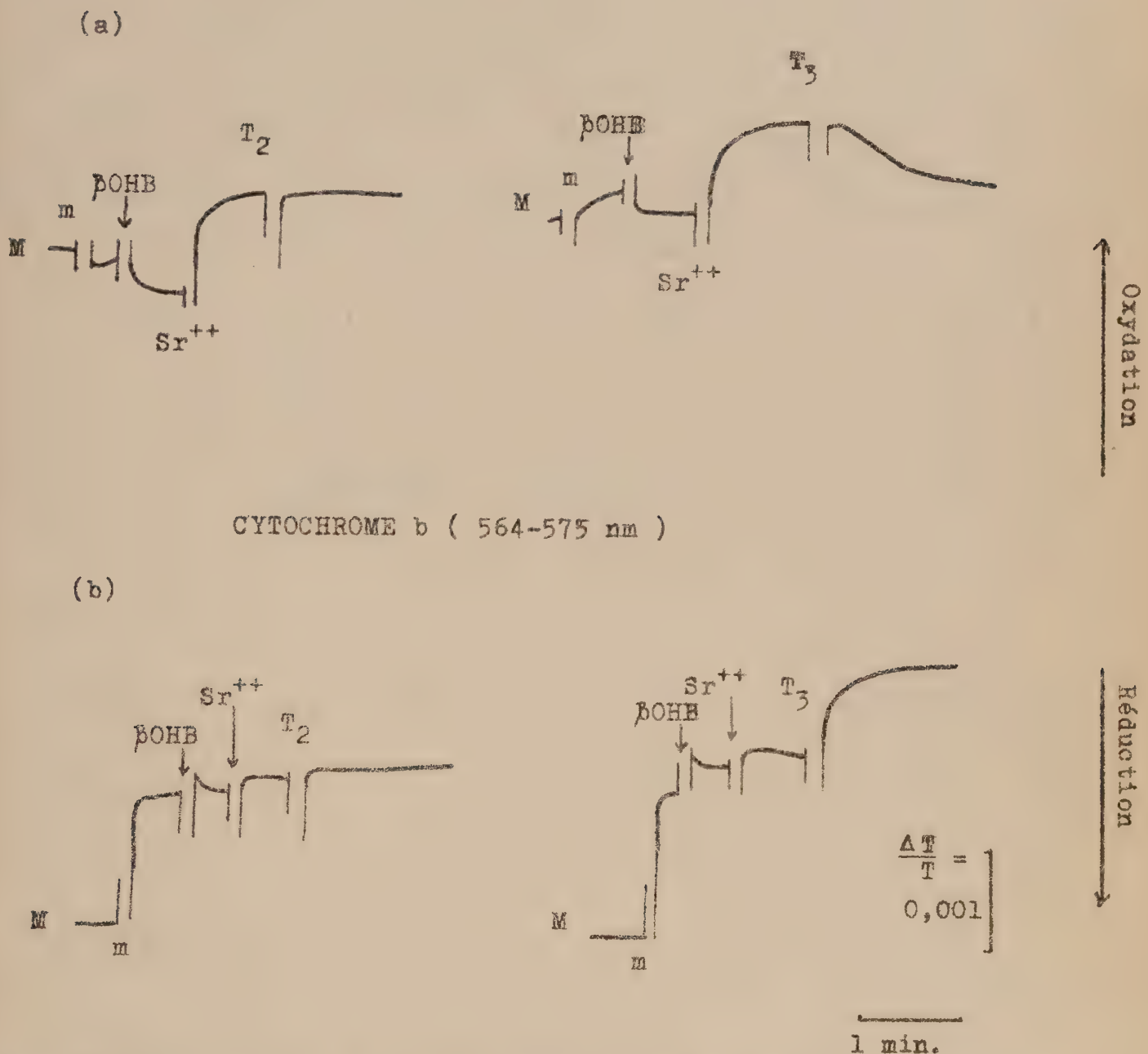
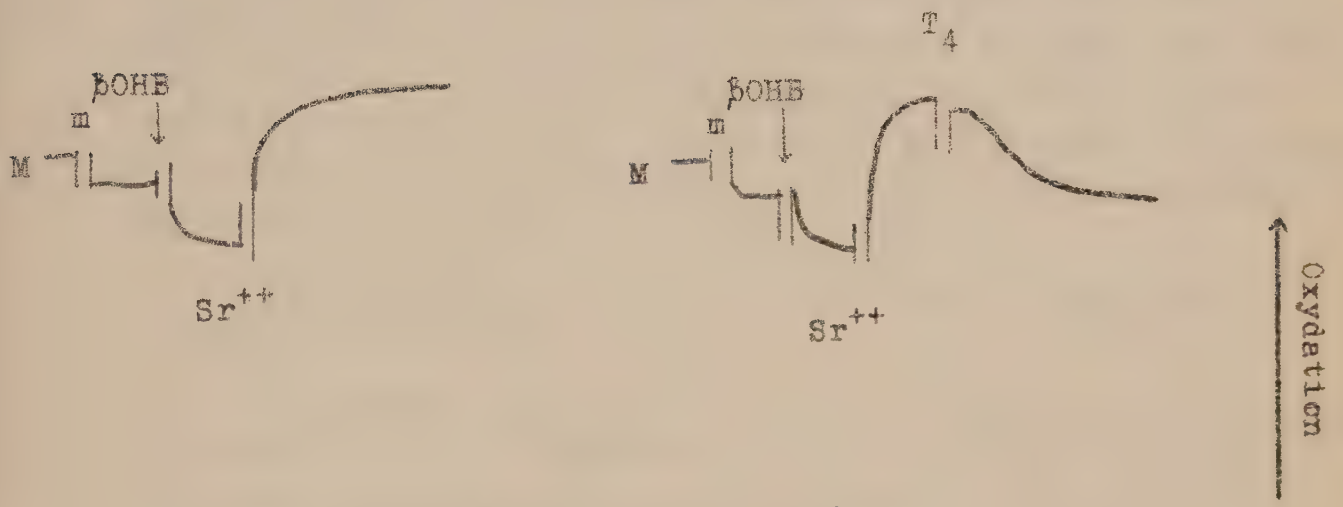


Figure 30 - Variations de l'état redox de fp (a) et cyt b (b) par addition de 3,5,3'triiodo-L-thyronine (T_3) en présence de strontium (Sr^{++}).

M : mitochondries 2,4 mg de protéines/ml
m : malonate 2 mM
βOHB : βhydroxybutyrate de sodium 2 mM
$SrCl_2$: 3,3 mM
T_3 ou T_2 : 120 nmoles/mg de protéine

FLAVOPROTEINES (465-510 nm)

(a)



CYTOCHROME b (564-575 nm)

(b)

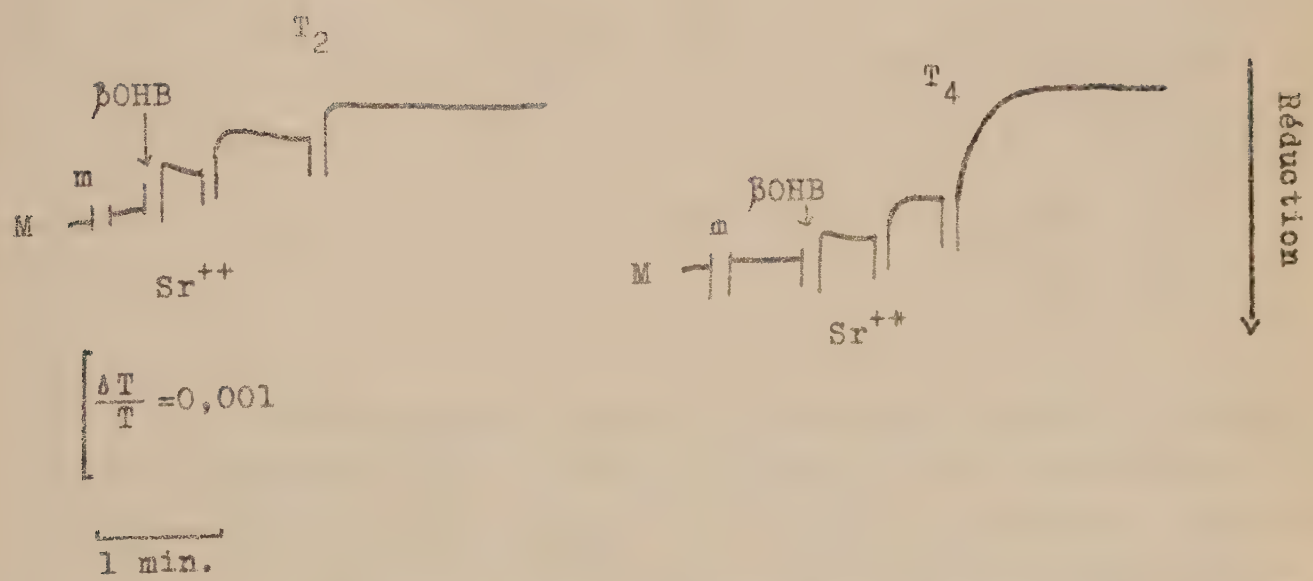


Figure 31 - Variations de l'état redox des flavoprotéines (a) et du cytochrome b (b) par addition de L-thyroxine (T_4) en présence de strontium (Sr^{++}).

M : mitochondries 2,1 mg de protéines/ml
m : malonate 2 mM
β OHB : β hydroxybutyrate de sodium 2 mM
$SrCl_2$: 3 mM
(a) : T_4=43 nmoles/mg de protéine
(b) : T_4 ou T_2 =58 nmoles/mg de protéine

Discussion

D'après les expériences précédentes où nous avons vu que les iodothyronines inhibaient l'action oxydante de l'ADP, on pouvait penser que leur effet se situerait au niveau des étapes de transfert de l'énergie mais puisque l'action est la même après strontium qui, lui, intervient dans les étapes de couplage et comme accepteur de phosphate, c'est donc que les iodothyronines agissent au niveau des réactions de couplage.

Plusieurs théories tendent à expliquer le mécanisme de transport des cations.

La première suppose que le cation se combinerait stoechiométriquement avec un intermédiaire riche en énergie produit par le transport des électrons. Le transport du cation serait ici unidirectionnel. CHANCE a proposé un modèle avec Ca^{++} où l'intermédiaire riche en énergie $X \sim I$ fixerait un proton qui serait éjecté au moment du transport de Ca^{++} vers l'intérieur : (54,98)

$$\underset{\text{ext}}{2\ Ca^{2+}} + \underset{\text{mb}}{H_2\ (X \sim I)} \longrightarrow \underset{\text{mb}}{Ca_2(X \sim I)} + \underset{\text{ext}}{2\ H^+}$$

$$Ca_2\ (X \sim I) \longrightarrow X + I + \underset{\text{int}}{2\ Ca^{2+}}$$

$$\text{mb}$$

Le deuxième modèle proposé par MITCHELL suppose un transporteur indépendant de la chaîne respiratoire qui transporterait Ca^{++} dans n'importe quelle direction à travers la membrane en réponse à un gradient électrochimique. Ce transporteur pourrait être neutre et transporter une charge anionique compensatrice avec Ca^{++} ou échanger une charge cationique telle que H^+, ou bien le transporteur est chargé et le transfert de Ca^{++} se fait en réponse à un gradient électrochimique engendré par le transport des électrons.

On peut alors supposer d'après la 1ère théorie que les iodothyronines T entreraient en compétition avec le cation pour donner naissance à un complexe (X ∾ I) T plus stable que celui formé avec le cation. Cette hypothèse expliquerait ainsi le découplage dû aux iodothyronines.

2) Mitochondries cardiaques de rat

Les résultats rapportés proviennent d'expériences réalisées avec des mitochondries d'origine cardiaque. Ces particules ont l'avantage d'avoir une concentration en coenzymes respiratoires supérieure à celles d'origine hépatique. Cependant leur conservation est plus difficile car une activité ATPasique se développe très vite. On est donc amené à utiliser un tampon exempt de Mg^{++} préconisé par KLINGENBERG (voir chapitre I) et composé de mannitol-saccharose-phosphate. Le substrat utilisé est du glutamate additionné de malate (39).

La figure 32 correspond à l'action de la thyroxine sur la respiration mitochondriale en état 3. La dose de 25 μM de T_4 qui inhibe la respiration avec un certain temps de latence provoque une réduction importante des flavoprotéines et une oxydation nette du cytochrome b. L'effet sur les coenzymes se fait aussi avec un retard d'au moins 30 secondes. On remarque sur la figure 33 que la L-thyroxine inhibe la consommation d'oxygène activée par le strontium (a). Simultanément les flavoprotéines (b) qui sont fortement oxydées en présence de strontium sont réduites après T_4 avec un court temps de latence. Quant aux cytochromes b (c) et c (d) ils sont suroxydés par T_4.

Les résultats obtenus avec les mitochondries cardiaques sont analogues à ceux des particules hépatiques. Il faut toutefois noter qu'avec les mitochondries cardiaques les quantités de protéines mitochondriales sont beaucoup plus faibles car leur respiration est plus active.

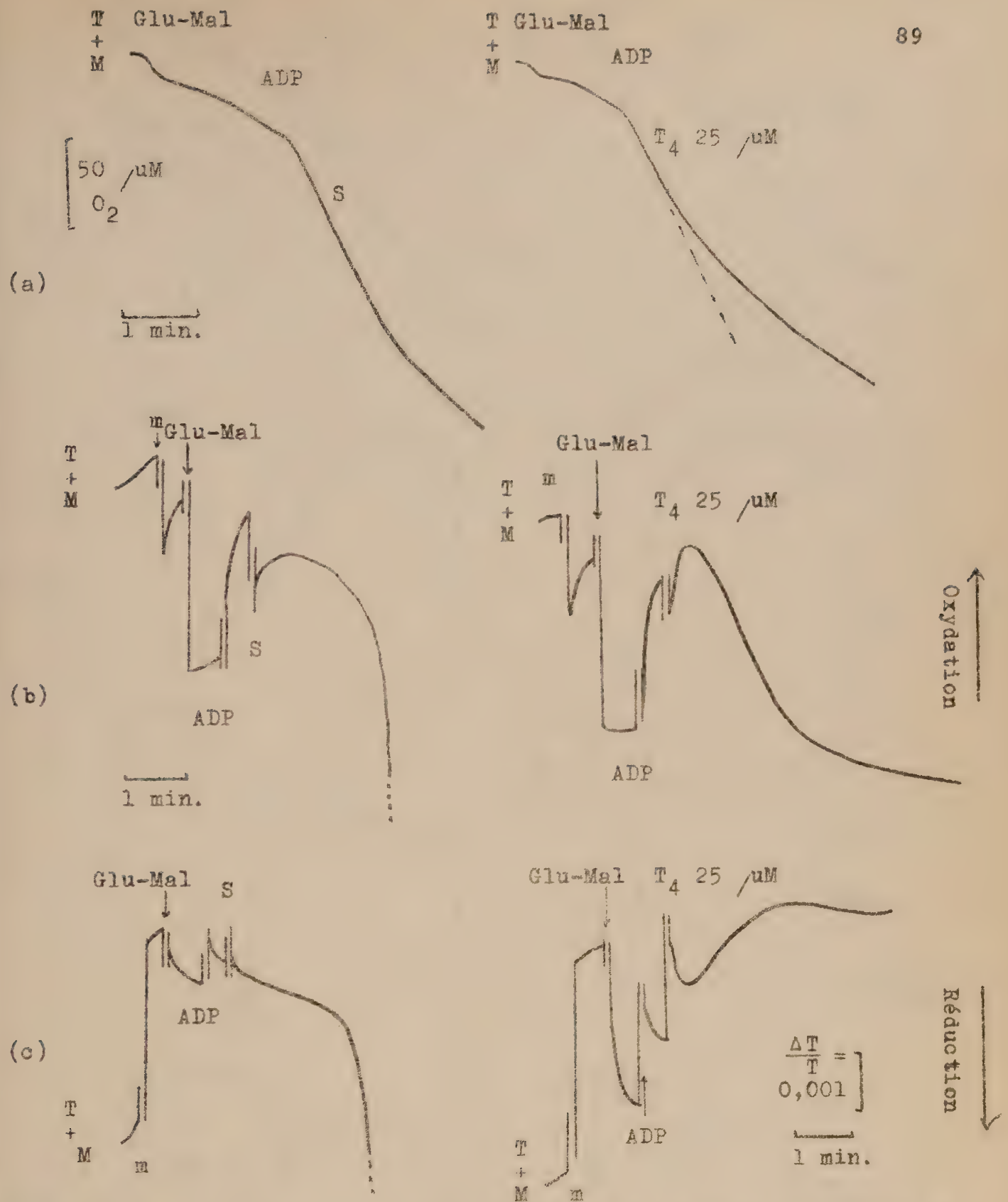


Figure 32 - Action de la L-thyroxine sur des mitochondries cardiaques de rat respirant en état 3.

(a) enregistrement oxygraphique de la respiration
(b) variations de l'état redox des flavoprotéines (465-510 nm)
(c) variations de l'état redox du cytochromm b (564-575 nm)
M:mitonhondries 1,58mg de protéines/ml ADP:0,9mM
T:tampon mannitol-saccharose-phosphate + malonate de sodium 2mM
Glu-Mal:glutamate + malate de sodium 2,5 mM
S:solvant de la L-thyroxine (T_4) NaOH N/10-H_2O (25-175 v/v)

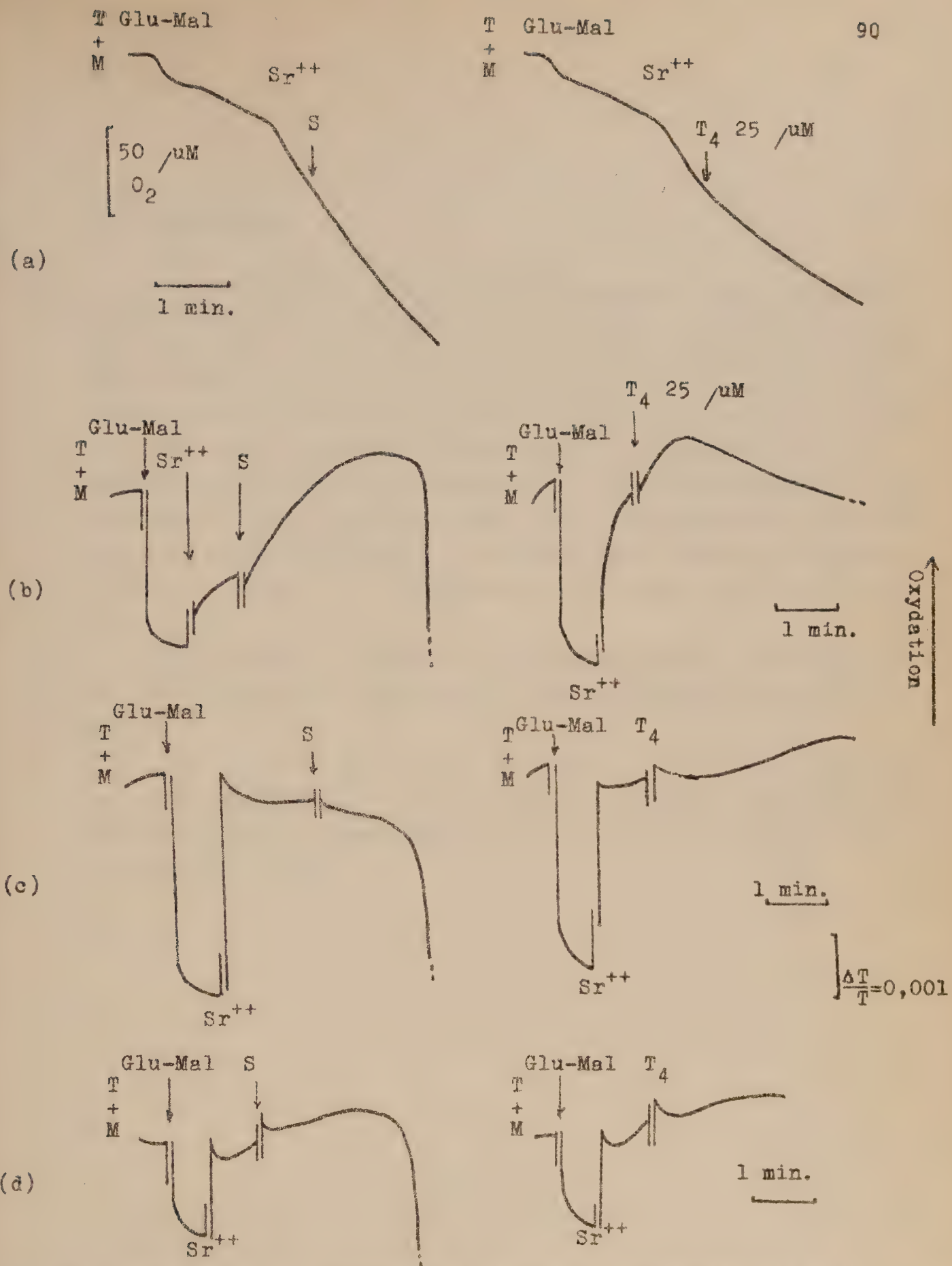


Figure 33 - Action de la L-thyroxine (T_4) sur la respiration (a) de mitochondries cardiaques de rat en présence de strontium (Sr^{++}) et l'état redox des flavoprotéines (465-510 nm) (b) du cytochrome b (564-575 nm) (c) du cytochrome c (540-550 nm) (d)

T:tampon mannitol-saccharose-phosphate + malonate de sodium 2mM

Sr^{++}:$SrCl_2$ 3,3mM Glu-Mal:glutamate+malate de sodium 2,5mM

M:mitochondries 1,6 mg de protéines/ml

III- Discussion

Les expériences relatées dans ce chapitre nous ont permis d'étudier successivement des inhibiteurs du transfert électronique d'une part, des agents de découplage des oxydations et phosphorylations d'autre part. Les résultats obtenus nous ont aidés à préciser les différents effets des iodothyronines qui tiennent à la fois des deux classes de composés : intervention sur les étapes de couplage mise en évidence par l'utilisation des cations divalents et par comparaison avec le 2,4-dibromophénol découplant type, et intervention sur le transport des électrons vraisemblablement au niveau de l'ubiquinone au carrefour des déshydrogénases.

Les résultats obtenus avec les mitochondries hépatiques de rat sont étendus et confirmés sur les particules d'origine cardiaque.

A ce stade de nos travaux il nous a paru important de rechercher quel pouvait être le comportement de l'ubiquinone vis-à-vis des découplants et des phénols iodés. C'est ce qui fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE IV

ROLE DE L'UBIQUINONE. VARIATIONS DE SON ETAT REDOX

I - Introduction

Plusieurs travaux ont été réalisés pour définir le rôle de l'ubiquinone au cours des réactions de transfert des électrons. Dans ce but on a utilisé l'action d'inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire (30), l'extraction des lipides et réincorporation des extraits. Il semble bien établi (160) que l'ubiquinone n'intervient pas seulement dans le transfert des électrons entre la succinodéshydrogénase et le complexe cyt b-c_1 et à partir de la NADH déshydrogénase (161,162) mais elle possède aussi un effet régulateur sur ces systèmes (163,164,165).

Les temps de demi réduction des composants de la chaîne respiratoire avec le NADH comme substrat et en présence d'un inhibiteur au niveau terminal montrent seulement de faibles différences mettant en évidence que la chaîne respiratoire agit comme une entité dans la réaction de réduction. Les taux initiaux de réduction (166) confirment que les flavoprotéines et l'ubiquinone qui sont près de la déshydrogénase sont les plus élevés tandis que le cytochrome est inférieur. L'ubiquinone qui présente une proportion de réduction plus élevée pourrait donc être le premier accepteur d'électrons.

Ces données ont été complétées par les déterminations de potentiels redox (167,168,169,170).

D'après les résultats concernant les états redox du cytochrome b et des flavoprotéines en présence d'iodothyronines, il nous a semblé intéressant d'étudier les variations de l'ubiquinone située au carrefour des deux déshydrogénases dans les mêmes conditions. Il semble d'ailleurs que sa biosynthèse soit sous la dépendance de l'état thyroïdien (171,172).

II - Résultats

Le tableau X résume les résultats obtenus en présence de divers substrats oxydables.

Nous avons calculé les variations du pourcentage d'Ubiquinone oxydée selon la méthode de KLINGENBERG détaillée au cours du permier chapitre, en état 4 et lors de la transition à l'état 3.

Pour les mitochondries hépatiques deux milieux différents ont été utilisés : soit celui de CHANCE, tampon A, soit celui de SLATER, tampon C. Les deux voies, celle de la succinodéshydrogénase et celle de la NADH déshydrogénase ont été étudiées.

Des déterminations ont été faites en présence de découplants le 2,4-dinitrophénol et le 2,4-dibromophénol qui provoquent une nette oxydation, comparable à celle obtenue avec les autres coenzymes. Le NAD a été déterminé dans l'expérience citée dans le même extrait que l'ubiquinone selon la méthode générale de KLINgenberg. Dans le cas des mitochondries de coeur nous avons utilisé le milieu saccharose-mannitol-phosphate tampon B préconisé par KLINGENBERG. On constate que la concentration globale d'ubiquinone est environ le double de celle qui se trouve dans le foie ce qui est en accord avec les résultats trouvés par KLINGENBERG (102). Mais les mitochondries d'origine cardiaque ont l'inconvénient de se conserver beaucoup moins longtemps que les mitochondries hépatiques quand on les prépare en l'absence d'agent complexant, on constate en effet qu'une activité ATPasique se développe rapidement.

TABLEAU X

Déterminations de l'état Redox de l'ubiquinone dans différents états respiratoires

Origine	Tampon	Substrat	total UQ n mole/mg protéines	ADP	Découplant	UQ ox %	NAD n mole/mg protéines
FOIE	A	β OHB	1,30	0	0	55	
				0	DNP	80	
	A	Succinate	1	0	0	75	
				0	DBP	100	
	A	β OHB	1,35	0	0	90	
				+	0	95	
COEUR	B	glu-mal + succinate	2,1	+	0	75	
	B	0	3	0	0	88	
FOIE	C	β OHB	1,62	0	0	2	1,9
				+	0	12	2,4

A : tampon CHANCE B : tampon mannitol sucrose-phosphate C : tampon préconisé par SLATER (voir p.99)

β OHB = β hydroxybutyrate glu-mal = glutamate-malate

TECHNIQUES D'INCUBATION

Au cours de travaux déjà anciens, HOCH et LIPMANN (173) utilisaient des techniques de préincubation avec des mitochondries de hamster, lesquelles paraissent particulièrement sensibles à l'effet de la thyroxine sur les mécanismes de phosphorylation.

BRONK et BRONK (174) ont obtenu des augmentations significatives de l'oxydation du succinate en présence de mitochondries de foie de rats thyroïdectomisés. CHANCE et HOLLUNGER (94) ont trouvé qu'un prétraitement à la thyroxine rendait les mitochondries plus réactives et qu'ainsi des changements de l'état d'oxydo réduction du NAD pouvaient être décelés avec des doses d'iodothyronine beaucoup plus faibles que sans contact préalable.

I - Effet de la thyroxine sur la réduction du NAD produite par le succinate de sodium

1) Conditions expérimentales

Les mitochondries hépatiques de rat sont mises en suspension dans un milieu (175) renfermant saccharose 0,25 M, phosphate de potassium 0,02 M pH 7,4 et Mg^{++} 5 mM.

Le substrat utilisé est le succinate de sodium à la concentration finale de 4 mM. Dès que les mitochondries sont mélangées au tampon, on enregistre les variations de l'état redox du NAD grâce au spectrophotomètre Aminco CHANCE muni d'une lampe à deuterium en utilisant les longueurs d'onde (λ_1 = 350nm ; λ_2 = 388nm). On ajoute ensuite la L-thyroxine ou son solvant (témoin) et on laisse au contact à 25°C pendant 1 minute 30 en présence des mitochondries. Le substrat est rapidement additionné puis l'ADP. On réalise simultanément à l'enregistrement spectro-

photométrique les variations de la respiration dans les mêmes conditions.

2) Résultats

La figure 34 illustre les résultats obtenus avec une concentration finale en L-thyroxine de 2 uM. Sur la partie supérieure est représenté l'enregistrement de la consommation d'oxygène. On constate qu'à cette dose de L-thyroxine, la respiration en état 4 est peu stimulée par rapport au témoin réalisé avec son solvant. Par contre, après l'addition d'ADP la vitesse respiratoire est légèrement diminuée en présence de thyroxine, laquelle semble agir en outre sur le taux de réduction du NAD par le succinate. En effet, le coenzyme est moins réduit en présence de succinate que dans le témoin effectué en présence de solvant seul. Quand l'état d'équilibre (état 4) est atteint, on ajoute 200 uM d'ADP mettant ainsi en évidence le cycle d'oxydoréduction des pyridine-nucléotides.

L'ADP produit dans les deux enregistrements une oxydation du NAD mais celle-ci est beaucoup plus prolongée et la réaction liée à l'énergie n'est plus capable de réduire complètement le NAD en présence du phénol iodé.

3) Discussion

La préincubation des mitochondries avec la L-thyroxine constitue une méthode particulièrement sensible pour permettre de déceler l'effet de concentrations faibles d'effecteur par enregistrement de la réduction du NAD liéeà laprésence de succinate. Les réactions diffèrent assez nettement de celles qui s'opèrent dans les particules non phosphorylantes (176) où il s'agit d'une oxydoréduction du type :

$$\text{Fumarate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{Succinate}$$

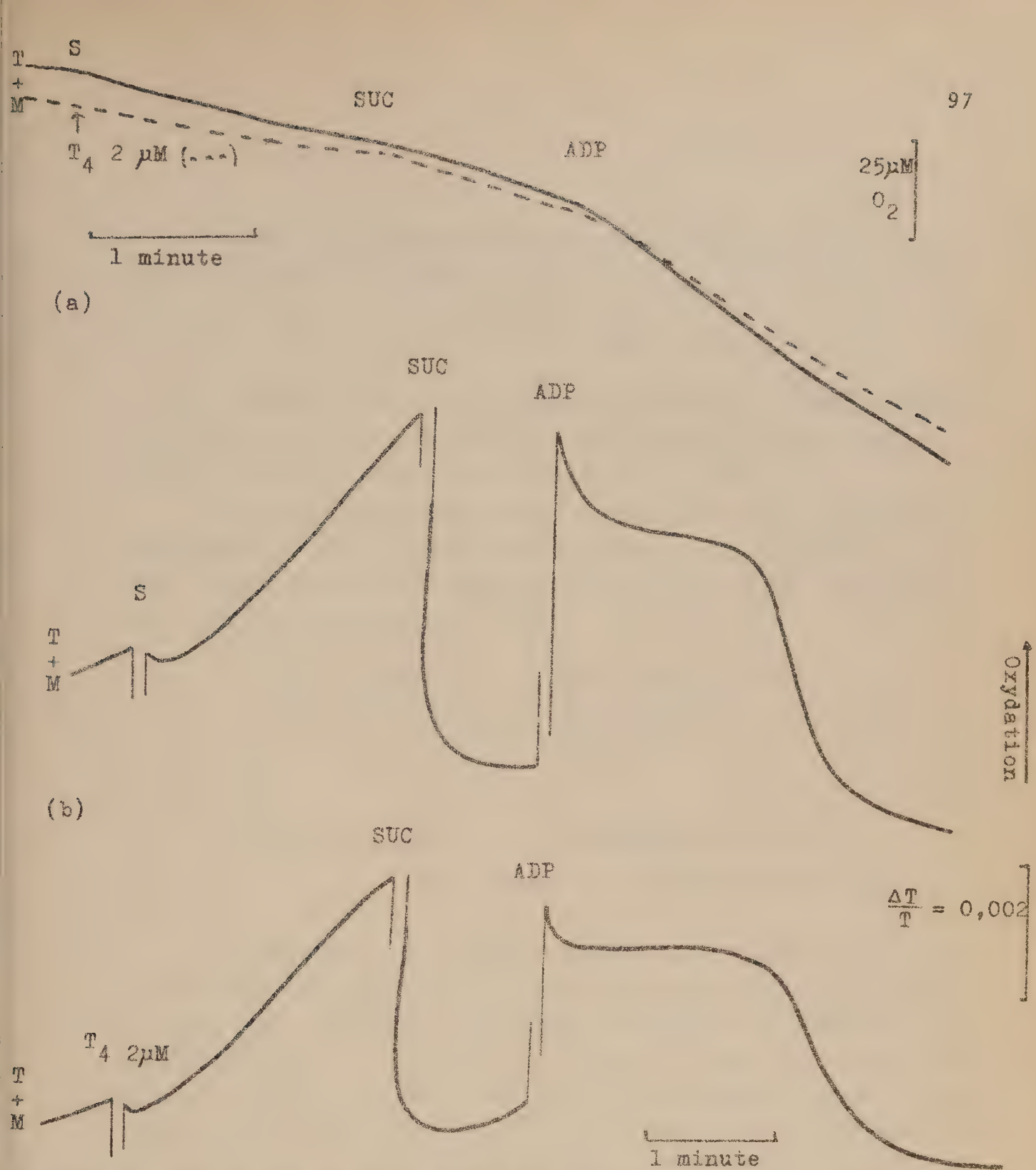


Figure 34 - Action de faibles doses de L-thyroxine sur la respiration(a) et l'état redox du NAD (350-388 nm) en présence de succinate

T : tampon
M : mitochondries 0,43 mg de protéines/ml
ADP : 200 µM
SUC : succinate de sodium 4mM
T_4 : L-thyroxine 2µM préincubation de 1 minute 30
S : solvant de la thyroxine NaOH N/10-H_2O(25-75 v/v)

En effet la réversibilité de cette réaction requiert de l'énergie selon le schéma :

$$NAD^+ + AH_2 + X \sim I \longrightarrow NADH + H^+ + A^+ + X + I$$

La réduction du NAD longuement étudiée par CHANCE (175,177, 178,179,180,181,182) et ERNSTER (183) peut intervenir dans un certain nombre de transferts d'électrons (184).

L'énergie nécessaire serait fournie par les intermédiaires des réactions de phosphorylation oxydative et la voie de réduction du NAD à partir du succinate serait celle des transporteurs de la chaîne respiratoire :

$$X \sim I + NAD^+ + H^+ + \text{Flavoprotéine réduite} \rightleftharpoons NADH + \text{Flavoprotéine} + X + I$$

soit encore

$$2\ X \sim I + NAD^+ + H^+ + \text{Flavoprotéine réduite} \rightleftharpoons NADH \sim I + \text{Flavoprotéine} + 2\ X + I$$

La rapidité de la réaction dépend de la concentration de l'intermédiaire hypothétique riche en énergie. Ainsi selon ce schéma (94) en présence d'un agent découplant le composé $X \sim I$ serait scindé en X + I. Dans ce travail il semble donc que l'on puisse mettre en évidence une réponse découplante de la L-thyroxine et ceci pour des doses très faibles : elle se manifesterait par une moindre réduction du NAD par le succinate. Par ailleurs on constate un ralentissement respiratoire en état 3 vraisemblablement dû à l'effet de la L-thyroxine sur le transfert des électrons.

II- Variations de l'état d'oxydoréduction du NAD et de l'ubiquinone sous l'effet de la thyroxine, après préincubation, à partir du βhydroxybutyrate de sodium.

Dans cette série de recherches nous avons tenté de freiner les mécanismes d'oxydophosphorylation en opérant à la température de 10°C. Ceci permet d'observer d'une part les cinétiques de transition de l'état 4 à l'état 3 (expérience témoin) dans les mêmes conditions que SLATER (185) et de suivre les effets de la L-thyroxine sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes. Sa technique a été mise en oeuvre dans le but de dissocier les deux effets des iodothyronines : découplage et inhibition du transfert des électrons.

Pour le NAD nous avons utilisé une méthode cinétique en enregistrant en continu au spectrophotomètre, les variations d'absorption à 350-388nm. Pour l'ubiquinone, nous avons réalisé des dosages sur des échantillons prélevés à des temps déterminés selon la technique de KROGER et KLINGENBERG (102).

1) Cinétique des variations de l'état redox du NAD

a) Conditions expérimentales

Nous avons repris les conditions expérimentales utilisées par SCHACHINGER (186) et VAN DAM (187).

Un volume de 0,1 ml environ de mitochondries contenant 7 à 10mg de protéines en suspension dans du saccharose 0,25 M sont mises à incuber pendant 5 minutes à la température de 10°C dans un tampon à pH 7,4 dont la composition est la suivante :

KCl 14,3mM ; $MgCl_2$ 8,5mM; KF 17,1mM, glycylglycine 285,1mM βhydroxybutyrate de sodium 14,3mM et phosphate de potassium 14,3mM.

b) Résultats

La figure 35 rend compte des variations de l'état redox des pyridine nucléotides (350-388nm). Cet enregistrement a été réalisé à l'aide du spectrophotomètre différentiel à double longueur d'onde thermostaté à 10°C.

Sur le premier tracé seul le solvant de la L-thyroxine est ajouté aux mitochondries (7,2mg de protéines) mises à incuber pendant 5 minutes dans 3 ml de tampon glycyl glycine contenant déjà le β hydroxybutyrate comme substrat. A cette température la respiration de l'état 4 est très ralentie et seule une faible oxydation du NAD se produit. Le passage à l'état 3 obtenu par addition de 0,05 ml d'une solution d'ADP 50mM se traduit par une nette oxydation du coenzyme qui dure jusqu'à la consommation totale de l'ADP.

Le deuxième tracé est réalisé par incubation pendant 5 minutes de L-thyroxine (à la concentration de 96 m/u moles par mg de protéines) en présence de mitochondries dans le tampon contenant le substrat comme dans l'expérience témoin. On constate au bout de 1 à 2 minutes une oxydation considérable du NAD en état 4.

L'addition de 0,05 ml d'une solution d'ADP 50mM provoque tout d'abord une réduction du NAD qui ne s'oxyde que lentement et faiblement ensuite.

2) Déterminations de l'état redox de l'ubiquinone

Nous avons dosé parallèlement et dans les mêmes conditions de température et de concentrations rapportées au mg de protéines mitochondriales, la quantité d'ubiquinone sous forme oxydée selon la méthode décrite dans le premier chapitre.

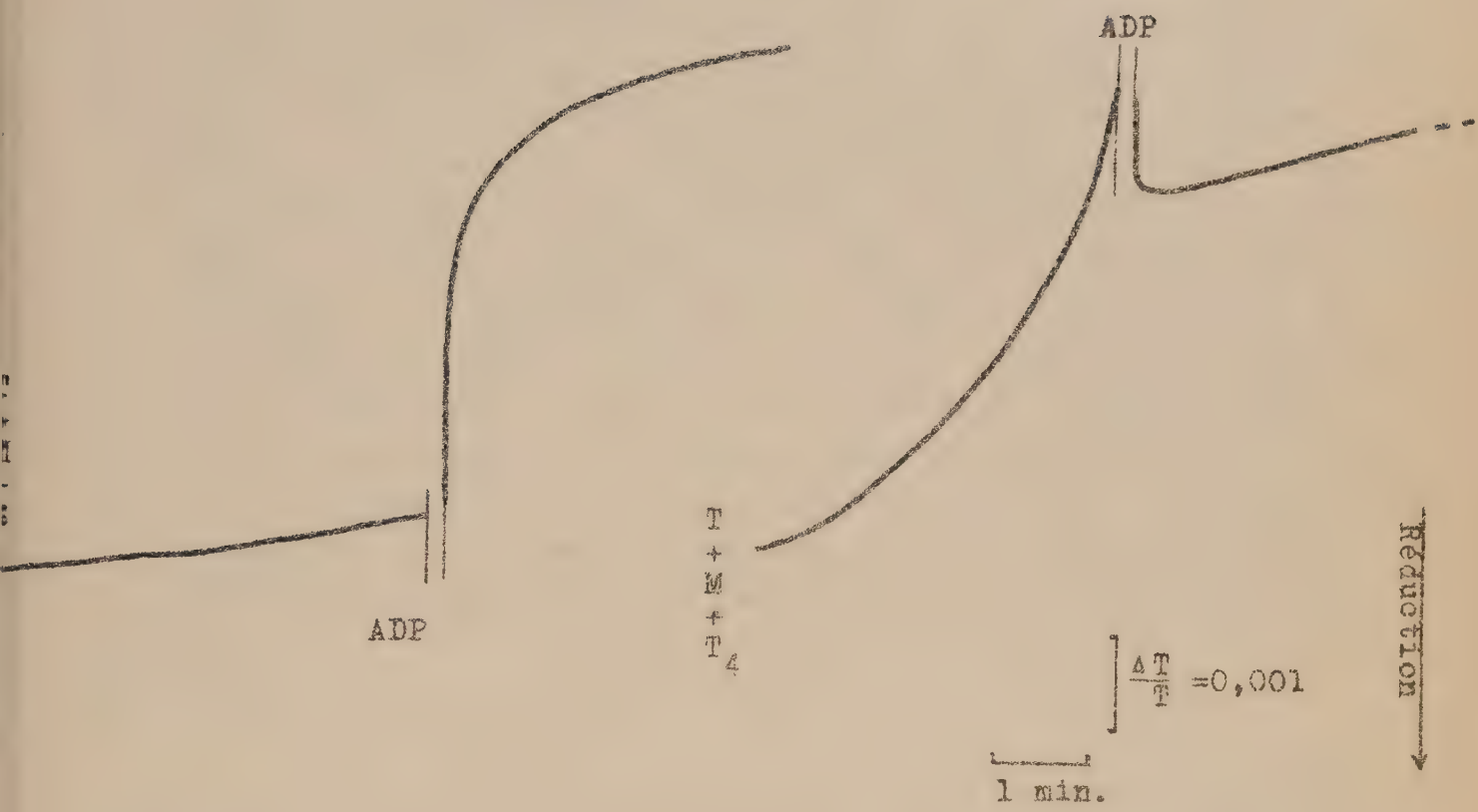


Figure 35- Variations de l'état redox du NAD(350-388 nm) sous l'effet de la L-thyroxine (T_4) comparé au témoin réalisé avec son solvant (S)

température : 10° C
T_4 :L-thyroxine 96 nmoles par mg de protéines incubation de 5 minutes
T :tampon pH 7,4 contenant β hydroxybutyrate
M :mitochondries 2,6 mg de protéines par ml
ADP :0,16 mM
S :solvant de T_4

a) Conditions expérimentales

Dans l'expérience représentée sur la figyre 36: 0,1 ml de suspension mitochondriale contenant 7,3mg de protéines sont ajoutées à 0,35 ml de tampon contenant 100/u moles de glycyl-glycine pH 7,4, 5/u moles de KCl, 6/u moles de KF, 3/u moles de $MgCl_2$, 5/u moles de β hydroxybutyrate de sodium et 5/u moles de phosphate de potassium. On laisse les mitochondries à incuber pendant 5 minutes en présence de L-thyroxine ou de son solvant (S) NaOH 0,05 N. Au temps zéro, 0,05 ml d'une solution d'ADP 50 mM sont ajoutées. Pendant toute la durée de l'expérience la température est maintenue à 10°C. Les extractions d'ubiquinone sont réalisées par addition du mélange éther de pétrole-méthanol (30-70 V/V) contenant 0,2 M d'acide perchlorique. Nous avons déterminé la quantité d'ubiquinone oxydée par la différence d'absorption avant et après réduction par le borohydrure de sodium (voir chapitre I).

b) Résultats

La figure 36 illustre les résultats obtenus. Le point zéro réalisé sans addition d'ADP rend compte de l'état redox de l'ubiquinone en état 4. Cette détermination est particulièrement intéressante car elle montre qu'en présence de L-thyroxine le coenzyme Q s'oxyde très fortement. Ce résultat est à rapprocher des cinétiques précédemment obtenues avec le NAD dans les mêmes conditions.

En présence d'ADP on constate comme SLATER (185) qu'avec le β hydroxybutyrate de sodium, l'oxydation se manifeste après une courte réduction (expérience témoin réalisée avec le solvant S de la L-thyroxine) ce qui ne se produisait pas avec le NAD. Par ailleurs en présence de l'iodothyronine, il semble y avoir en état 3 une réduction de l'ubiquinone encore plus importante que dans le témoin, qui est suivie plus tardivement d'une oxydation.

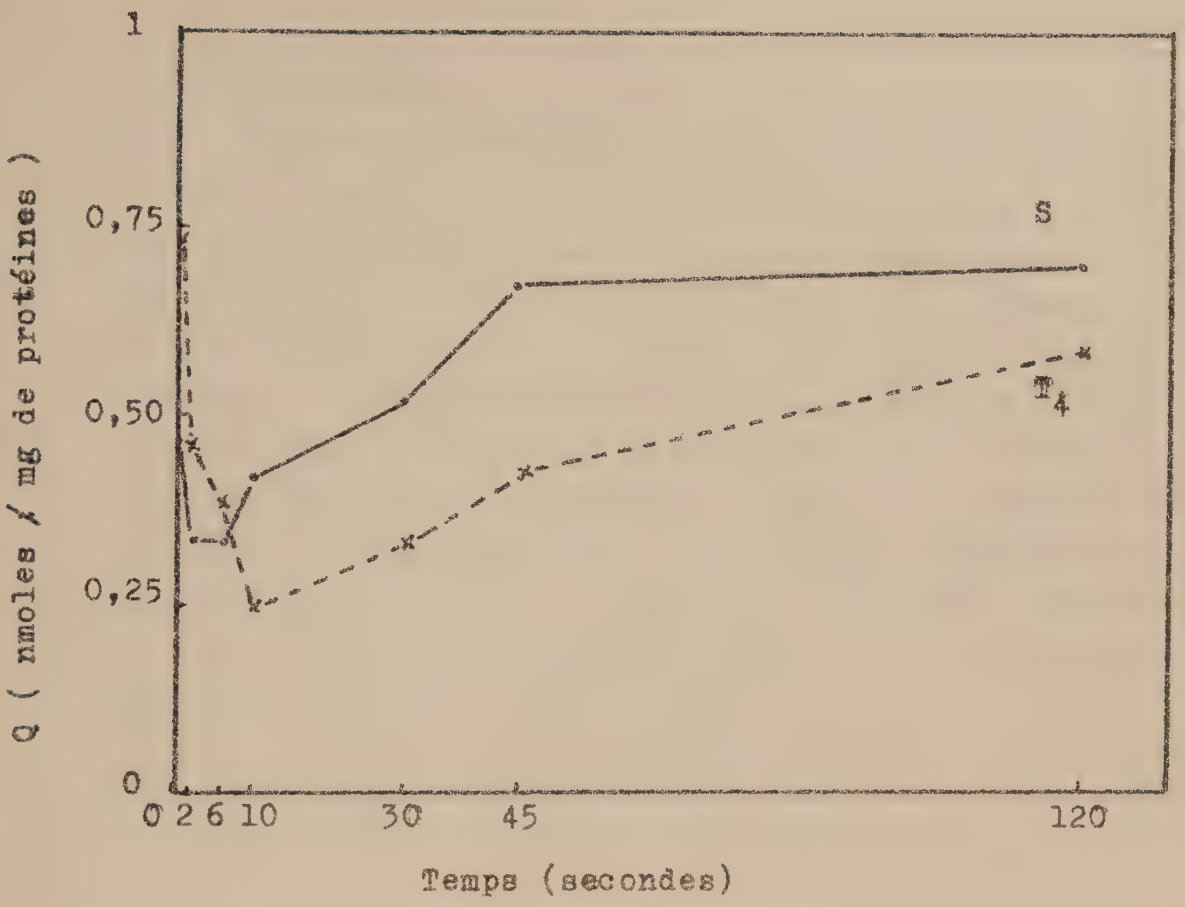


Figure 36 - Variations de l'état redox de l'Ubiquinone (Q) par addition d'ADP (temps zéro) à des mitochondries en état 4 (témoin solvant S) ou préincubées en présence de L-thyroxine T_4 pendant 5 minutes

0,1 ml d'une suspension mitochondriale à 73 mg de protéines/ml sont ajoutés à 0,35 ml de tampon contenant:100 µmoles glycyl-glycine pH 7,4 ;5 µmoles KCl;6 µmoles KF;3 µmoles $MgCl_2$;5 µmoles β hydroxybutyrate de sodium;5 µmoles phosphate de potassium. Au temps zéro:addition de 0,05 ml d'une solution d'ADP 50 mM Expérience réalisée à 10°C.

Lecture à 275 nm.

3) Discussion

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces résultats.

La première concerne le comportement tout à fait particulier de l'ubiquinone après l'addition d'ADP. Comme l'avait prévu VAN DAM (187) et retrouvé SLATER (185), le coenzyme Q passe par un état réduit avant de s'oxyder comme le font tous les autres coenzymes à l'exception peut-être du cytochrome a (188,111). Il apparaît que la réduction du coenzyme Q par le NADH se produit plus rapidement que l'oxydation de QH_2 par l'oxygène. HELDT (189) et KEMP (190) ont montré que la réaction limitante était la translocation de l'ADP en ATP et ces résultats s'expliquent si le site III de phosphorylation requiert une plus grande concentration d'ADP ou un rapport ADP/ATP plus grand. On peut interpréter ce phénomène par la théorie chimique en supposant que la réaction donnée par l'équation 2 a une plus grande affinité pour l'ADP aux sites I et II qu'au site III .

$$1)\quad AH_2 + B + C \rightleftharpoons A \sim C + BH_2$$

$$2)\quad A \sim C + ADP + Pi \rightleftharpoons A + C + ATP$$

En second lieu, l'oxydation du NAD et de l'ubiquinone par la L-thyroxine en présence de mitochondries respirant en état 4 montre l'action découplante de celle-ci; la technique utilisée permettant de dissocier alors la réponse découplante de celle inhibitrice sur le transfert des électrons grâce au fait que la préincubation sensibilise les mitochondries à l'action des iodothyronines.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail a porté d'une part sur les relations entre les activités des hormones thyroïdiennes et leur métabolisme en présence de mitochondries isolées de rat et d'autre part sur l'influence qu'exercent les iodothyronines et certains agents découplants sur les oxydophosphorylations.

Le délai fréquemment observé pour que se manifeste chez l'animal l'action des produits thyroïdiens a été attribué soit à un temps de mise en place sur les récepteurs, soit à la formation d'un métabolite actif. In vitro, au contraire, les effets mitochondriaux sont rapides mais il n'est cependant pas démontré que les hormones arrivent immédiatement au niveau des sites actifs et agissent sans modifications de structure, aussi avons-nous entrepris des études sur la pénétration et le métabolisme de la L-thyroxine et de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine en relation avec leur action sur les oxydophosphorylations. Les résultats de ces expérimentations montrent que les produits thyroïdiens sont fixés rapidement et intensément par les particules. Le pourcentage retenu est sensiblement le même - 75 p.cent environ de la quantité mise en oeuvre - dès la quinzième seconde après l'addition de l'hormone, il n'existe aucune relation entre les effets hormonaux et la fixation par les particules, elle est indépendante de la température, de la nature et de la concentration des substrats oxydables, de l'état thermodynamique mitochondrial et du fonctionnement de la chaîne respiratoire. On peut

penser que la captation ne procède sans doute pas d'un mécanisme actif. Les recherches sur le métabolisme n'ont pas permis de déceler un changement moléculaire de T_3 ou T_4 lors de leur action sur les mitochondries.

Les iodothyronines stimulent la respiration des mitochondries placées dans l'état contrôlé et l'inhibent aux mêmes doses quand elles sont dans l'état actif. Nous avons montré que le 2,4-dibromophénol, agent découplant non coloré, possède un comportement qualitativement semblable mais les concentrations frénatrices de l'état 3 sont beaucoup plus élevées que celles qui activent considérablement l'état 4. Ces résultats mettent en évidence que les hypothèses concernant les mécanismes d'action proposés pour les découplants ne s'appliquent sans doutepas complètement aux iodothyronines.

Les essais réalisés sur l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires confirment d'ailleurs ce point de vue, car si l'effet découplant des iodothyronines est démontré par le fait que le taux de réduction du NAD en présence de succinate selon la voie inverse du transfert des électrons est diminué en présence de L-thyroxine, cependant les études de l'état redox des transporteurs d'électrons au cours du transfert par la voie directe font apparaître un comportement différent pour les iodothyronines et les agents découplants car à dose inhibitrice ces derniers oxydent tous les coenzymes sans doute en intervenant compétitivement avec les substrats au niveau des transporteurs membranaires spécifiques, alors que les phénols iodés favorisent la réduction de certains coenzymes et l'oxydation d'autres. En effet, nos recherches ont étendu et complété avec les iodothyronines les résultats obtenus avec l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique. Tous ces phénols iodés provoquent la réduction des flavoprotéines correspondant aux deux déshydrogénases et l'oxydation du cytochrome b de mitochondries hépatiques ou cardiaques

placées dans l'état 3 ou 4. De plus, nous avons montré que le degré d'oxydoréduction du cytochrome c et du NAD évoluait en présence d'iodothyronines dans le même sens respectivement que ceux du cytochrome b et des flavoprotéines. Des données analogues ont été obtenues quand on remplace l'ADP par le strontium qui active considérablement la respiration mitochondriale dans l'état contrôlé.

L'ensemble de ce travail permet de définir l'existence d'un "cross over point" au cours de l'action des iodothyronines dans les mécanismes d'oxydophosphorylation, le point d'impact est localisé entre les flavoprotéines et le cytochrome b, par conséquent en dehors des sites de phosphorylation.

Cependant comme l'ubiquinone est située entre ces deux transporteurs au carrefour des déshydrogénases, il importait de savoir quelle était l'incidence des iodothyronines sur son état redox. Les essais entrepris nous montrent que la L-thyroxine provoque sa réduction, il est donc vraisemblable que le "cross over point" se situe entre l'ubiquinone et le cytochrome b et par conséquent que le point d'intervention de celle-ci est localisé au carrefour des deux déshydrogénases.

En conclusion, les iodothyronines affectent la respiration des mitochondries de deux façons simultanées mais opposées. D'une part, elles agissent comme des agents découplants puisqu'elles activent la consommation d'oxygène des mitochondries placées dans l'état 4 et favorisent l'oxydation du NAD dans le transport inverse des électrons à partir du succinate, d'autre part, elles se comportent comme des inhibiteurs respiratoires car elles freinent le transfert électronique immédiatement en amont du cytochrome b. Les effets de la L-thyroxine et de la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine sont donc complexes, on peut considérer qu'elles appartiennent à la classe des découplants mixtes.

B I B L I O G R A P H I E

1- LEHNINGER, A.L.

dans The Mitochondrion,1964
Benjamin ed. N.Y.

2- ERNSTER,L. et LEE,C.P.

Ann.Rev.Biochem.,(1964),33,729

3- LEHNINGER,A.L.

Fed.Proc.,(1960),19,952

4- RACKER,E.

Advances in Enzymology
NORD F.F. ed.,23 p.323, N.Y. Interscience (1961)

5- QUAGLIARIELLO,E.

Mitochondrial Structure and Compartmentation
Adriatica ed.,(1967),p.15

6- PARSONS,D.F.

Mitochondrial Structure and Compartmentation
Adriatica ed.,(1967),p.23

7- PARSONS,D.F.,WILLIAMS,G.R.,THOMPSON,W.,WILSON,D. et CHANCE,B.

Mitochondrial Structure and Compartmentation
Adriatica ed.(1967),p.29

8- HARRIS,E.S. et HANGER,J.R.

Biochem.J.,(1969),113,617

9- PFAFF,E.

Mitochondrial Structure and Compartmentation
Adriatica ed.,(1967),p.165

10- WERKEISER,W.C. et BARTLEY,W.

Biochem.J.,(1957),66,79

11- CHAPELL,J.B. et GROFTS,A.R.

dans Regulation of Metabolic Processes, in Mitochondria,
B.B.A.Library,vol.7,(1966),p.293
TAGER,J.M.,PAPA,S.,QUAGLIARIELLO,E. et SLATER,E.C.ed.,
Elsevier,Amsterdam

12- CHAPPELL,J.B. et HAARHOFF,F.N.

Biochemistry of mitochondria,
Academic Press,(1966)p.75

13- CHANCE,B.,WILSON,D.F.,DUTTON,P.L. et ERECINSKA,M.
Energy Coupling Mechanisms in mitochondria : kinetic,spectroscopic and thermodynamic properties of an energy transducing form of cytochrom b (1969)

14- TYLER,D.D.,ESTABROOK,R.W. et SANADI,D.R.
Arch.Biochem.Biophys.,(1966),114,239

15- SLATER,E.C.,LEE,C.P.,BERDEN,J.A. et WEGDAM,H.J.
Biochim.Biophys.Acta,(1970),223,354

16- DUTTON,P.L.,WILSON,D.F. et LEE,C.P.
Biochemistry,(1970),9,5077

17- RIESKE,J.S.
Arch.Biochem.Biophys.,(1971),145,179

18- HEATON,F.W.,LOWE,J.S. et MORTON,R.A.
Biochem.J.,(1955),60,18 P

19- HEATON,F.W.,LOWE,J.S. et MORTON,R.A.
J.Chem.Soc.,(1956),4094

20- HEATON,F.W.,LOWE,J.S. et MORTON,R.A.
Biochem.J.,(1957),67,208

21- MORTON,R.A.
Nature (London),(1958),182,939

22- MERWYN,L. et MORTON,R.A.
Biochem.J.,(1959),72,106

23- MORTON,R.A.,WILSON,G.M.,LOWE,J.S. et LEAT,W.M.F.
Chem.and Ind.,(1957),1649

24- HEMMING,F.W.,PENNOCK,J.F. et MORTON,R.A.
Biochem.J.,(1958),68,29 P

25- CRANE,F.L.,HATEFI,Y.,LESTER,R.L. et WIDMER,C.
Biochim.Biophys.Acta,(1957),25,220

26- GREEN,D.E. et WHARTON,D.C.
Biochem.Z.,(1963),338,335

27- FERNANDEZ-MORAN,G.,ODA,T.,BLAIR,P.V. et GREEN,D.E.
J.Cell.Biol.,(1964),22,63

28- BLAIR,P.V.,ODA,T.,GREEN,D.G. et FERNANDEZ-MORAN,G.
Biochemistry,(1963),2,756

29- SZARKOWSKA,L. et KLINGENBERG,M.
Biochem.Z.,(1963),338,674

30- REDFEARN,E.R. et PUMPHREY,A.M.
Biochem.J.,(1960),76,64

31- POE,M.,GUTFREUND,H. et ESTABROOK,R.W.
Arch.Biochem.Biophys.,(1967),122,204

32- POE,M.
Arch.Biochem.Biophys.,(1968),128,725

33- GRIFFITHS,O.E.
Oxidative phosphorylation dans Essays of Biochemistry,1965,p.91
CAMPBELL,P.N. et GREVILLE,G.D.ed.,Biochemical Society,Acad.Press

34- MASSEY,V. et VEEGER,C.
Ann.Rev.Biochem.,(1964),33,p.579

35- ERNSTER,L.,DALLNER,G. et AZZONE,G.F.
Biochem.Biophys.Res.Commun.,(1963),10,23

36- ERNSTER,L.,DALLNER,G. et AZZONE,G.F.
J.Biol.Chem.,(1963),238,1124

37- RACKER,E.
Mechanisms in Bioenergetics
Academic Press,N.Y.,(1965),p.13

38- CHANCE,B. et WILLIAMS,G.R.
Advance in Enzymology,(1956),17,65

39- MITCHELL,P.
Nature,(1957),180,134

40- MITCHELL,P.et MOYLE,J.
Nature,(1958),182,372

41- MITCHELL,P.et MOYLE,J.
Proc.Roy.Phys.Soc. (Edinburgh),(1958),27,61

42- MITCHELL,P.
Nature,(1961),191,p.114

43- MITCHELL,P.
Biochem.Soc.Sym.(Cambridge,Eng.),(1962),22,p.142

44- MITCHELL,P.
dans Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria
B.B.A.Library,Vol.7,(1966),p.65, Elsevier,Amsterdam

45- RACKER
dans Mechanisms in Bioenergetics (1965)
Academic Press, New York,p.145

46- SLATER,E.C.
dans Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria
B.B.A.Library,Vol.7,(1966),p.166,Elsevier,Amsterdam

47- SLATER,E.C.
Proc.5th Intern.Congress Biochem.,Moscow,(1961),5,p.325
Pergamon Press, Oxford

48- HATASE,O,YAMAMOTO,G. et ODA,T.
Acta Med.Okayama,(1969),23,227-255

49- MICHELL,P.et MOYLE,J.
Biochemistry of Mitochondria,
Academic Press,(1966),p.53

50- BIELAWSKI,J.,THOMPSON,T.E. et LEHNINGER,A.L.
dans Mitochondrial Structure and Compartmentation,
Adriatica ed.,(1967),p.181

51- LEHNINGER,A.L.,CARAFOLI,E. et ROSSI,C.S.
Advance in Enzymology,(1967),29,259

52- LARDY,H.A. et FERGUSON,S.M.
Ann.Rev.Biochem.,(1969),38,713

53- LEHNINGER,A.L.
Biochem.J.,(1970),119,129

54- CHANCE,B.
J.Biol.Chem.,(1965),240,2729

55- ROSSI,C.S. et LEHNINGER,A.L.
J.Biol.Chem.,(1964),239,3971

56- LEHNINGER,A.L.,ROSSI,C. et GREENAWALT,J.W.
Biochem.Biophys.Res.Commun.,(1963),10,444

57- ROSSI,C.S. et LEHNINGER,A.L.
Biochem.Z.,(1963),338,698

58- VASINGTON,F.D. et MURPHY,J.V.
Fed.Proc.Fed.Am.Soc.Exp.Biol.,(1961),20,146

59- VASINGTON,F.D. et MURPHY,J.V.
J.Biol.Chem.,(1962),237,2670

60- DE LUCA,H.F. et ENGSTRÖM,G.W.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.,(1961),47,1744

61- AZZI,A. et CHANCE,B.
Biochim.Biophys.Acta,(1969),189,141

62- SARIS,N.E.
Commentat.Phys.Mat.,(1963),28,59

63- GREENAWALT,J.W.,ROSSI,C.S. et LEHNINGER,A.L.
J.Cell.Biol.,(1964),23,21

64- THOMAS,R.C.,MANGER,J.R. et HARRIS,E.J.
European J.Biochem.,(1969),11,413

65- ADDANKI,S.,CAHILL,F.D. et SOTOS,J.F.
J.Biol.Chem.,(1968),243,2337

66- CHANCE,B.,AZZI,A. et MELA,L.
dans The Molecular basis of membrane function,
D.C.TESTESON ed.(1969)
by Prentice-Hall,Inc.,Englewood Clipps,New-Jersey,p.561-573

67- GHOSH,A.K. et CHANCE,B.
Arch.Biochem.Biophys.,(1970),138,483-492

68- GEAR,A.R.L.,ROSSI,C.S.,REYNAFARSE,B. et LEHNINGER,A.L.
J.Biol.Chem.,(1967),242,3403

69- ROSSI,C.S.,BIELAWSKI,J. et LEHNINGER,A.L.
J.Biol.Chem.,(1966),241,1919

70- CHANCE,B. et MELA,L.
J.Biol.Chem.,(1966),241,4588

71- LYNN,W.S. et BROWN,R.M.
Arch.Biochem.Biophys.,(1966),114,271

72- WEGDAM,H.J.,BERDEN,J.A. et SLATER,E.C.
Biochim.Biophys.Acta,(1970),223,365

73- SLATER,E.C.
Symp.Soc.Exp.Biol.,(1957),10,110

74- CARAFOLI,E.,WEILAND,S. et LEHNINGER,A.L.
Biochim.Biophys.Acta,(1965),97,88

75- LEHNINGER,A.L.
Physiol.Rev.,(1962),42,467

76- TAPLEY,D.F.,COOPER,C. et LEHNINGER,A.L.
Biochim.Biophys.Acta,(1955),18,597

77- LEHNINGER,A.L.
Ann.N.Y.,Acad.Sci.,(1960),86,484

78- HOCH,F.L.
Physiol.Rev.,(1962),42,605

79- HOCH,F.L.
J.Biol.Chem.,(1966),241,524

80- BRONK.J.R.
Biochim.Biophys.Acta,(1963),69,375

81- MICHEL,R. et LEBLANC,A.
Bull.Soc.Chim.Biol.,(1969),51,355

82- MICHEL,R. et MICHEL,O.
C.R.Soc.Biol.,(1967),161,1883

83- MICHEL,R. et LUCAS,M.
C.R.Soc.Biol.,(1968),162,853

84- MICHEL,R. et LUCAS,M.
Bull.Soc.Chim.Biol.,(1969),51,1047

85- HEMKER,H.C.
Biochim.Biophys.Acta,(1964),81,1

86- LINDBERG,O.,LOW,H.,CONOVER,T.E. et ERNSTER,L.
Biological Structure and Function
ed.T.W.GOODWIN et O.LINDBERG, Academic Press,(1961),2,3

87- MICHEL,R. et LEBLANC,A.
Bull.Soc.Chim.Biol.,(1969),51,373

88- CHANCE,B.,WILLIAMS,G.R. et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1963),238,439

89- MICHEL,R.
C.R.Soc.Chim.Biol.(1967),161,1944

90- QUAGLIARIELLO,E. et PALMIERI,F.
Eur.J.Biochem.,(1968),4,20

91- MICHEL,R. et PAIRAULT,J.
C.R.Acad.Sci.,(1969,268,1549

92- MICHEL,R.,ROCHE,J.,MICHEL,O.,GIRARD,M. et RALL,J.E.
J.Biol.Chem.,(1964),239,3062

93- MICHEL,R.,LEBLANC,A. et MICHEL,O.
Bull.Soc.Chim.Biol.,(1969),51,389

94- CHANCE,B. et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1963),238,445

95- HOCH,F.L.
Arch.Biochem.Biophys.,(1968),124,238-247

96- TURAKOLOV,Ya.Kh.,MIRAHMEDOV,A.K.,L'VOVICH,N.A. et HUSAINOVA,F.
Biokhimiya,(1970),35,349

97- CHANCE,B.
dans Energy-Linked functions of mitochondria,(1963),p.258
ed.CHANCE,B.,N.Y.,Academic Press

98- AZZI,A. et CHANCE,B.
Biochim.Biophys.Acta,(1969),189,141

99- PAPA,S. et FRANCAVILLA,A.
Mitochondrial Structure and Compartmentation,(1967),p.363
Adriatica ed.

100- SCHNEIDER,W.C. et HOGEBOOM,G.H.
J.Biol.Chem.,(1950),183,123

101- ROCHE,J.,RALL,J.E.,MICHEL,R.,MICHEL,O. et VARRONE,S.
Biochim.Biophys.Acta,(1962),56,188

102- KROGER,A. et KLINGENBERG,M.
Biochem.Z.,(1966),344,317

103- KIELLEY,W.W. et BRONK,J.R.
J.Biol. Chem.,(1958),230,521

104- ESTABROOK,R.W.
Methods in Enzymology,Vol.X,(1967),Academic Press,p.41

105- LEHNINGER,A.L. et WADKINS
Ann.Rev.Biochem.,(1962),31,47

106- CHANCE,B.
Ciba Found.Symp.Regulation metabolism,p.91
LittlenBrown,Boston,Mass.(1959)

107- CHANCE,B. et WILLIAMS,G.R.
Nature,(1955),175,1120

108- HAGIHARA,B.
Biochim.Biophys.Acta,(1961),46,134

109- LEHNINGER,A.L.
dans Bioénergétique, Ediscience,(1969).

110- CHANCE,B.
Science,(1954),120,767

111- CHANCE,B. et WILLIAMS,G.R.
J.Biol.Chem.,(1955),217,409

112- CHANCE,B.
Rev.Sci.Instr.,(1951),22,619

113- CHANCE,B. et HAGIHARA,B.
Proceedings of the fifth international congress of biochemistry
Moscou,(1961),5, Pergamon Press,Oxford,(1963),p.3

114- CHANCE,B.,MAYER,D.,GRAHAM,N. et LEGALLAIS,V.
Rev.Sci.Instr.,(1970),41,111

115- SLATER,E.C.
Rev.Pure Applied Chem.,(1958)8,221

116- CHANCE,B. et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1963),238,418

117- KLINGENBERG,M.
dans Methods in Enzymatic analysis,p.528
BERGMEYER,H.U.ed.,(1963),Academic Press,New York and London

118- LEGLER,R.,RUEGGER,A. et SALOMON,M.
Helv.Chim.Acta,(1939),22,1464

119- LINN,B.O.,PALE,A.C.,WONG,E.L.,GALE,P.M.,SHUNK,G.M. et FOLKERS,K.
J.Amer.Chim.Soc.,(1959),81,4007

120- MORTON,R.A. et FAHMY,N.I.
Biochem.J.,(1959),72,99

121- OLSON,R.E.,DIALAMEH,H.et BENTLEY,R.
The biosynthesis of coenzyme Q in Rats
A Ciba foundation Symposium on quinones in electron transport
(1961)p.284,Churchill Ltd,ed., London.

122- KLINGENBERG,M.
dans Rapid mixing and sampling technique in biochemistry
Academic Press,(1964),p.335

123- GREEN,D.E.,HATEFI,Y. et FECHNER,W.F.
Biochem.Biophys.Res.Commun,(1959),1,45

124- PUMPHREY,A.M. et REDFEARN,E.R.
Biochem.J.,(1960),76,61

125- CRANE,F.L.,LESTER,R.L.,WIDMER,C. et HATEFI,Y.
Biochim.Biophys.Acta,(1959),32,78

126- DEMAILLE,J.,VIGNAIS,P.M. et VIGNAIS,P.V.
Eur.J.Biochem.,(1970),13,416

127- PITT RIVERS et TATA
The thyroid hormones, Pergamon Press,(1959)

128- SALVATORE,G.
Exposés annuels de Biochimie médicale,(1964),p.99

129- YAMAMOTO,K.,SHIMIZU,S. et ISHIKAWA,I.
Japanese Journal of Physiology,(1960),10,n°6,p.594

130- RALL,J.E.,MICHEL,R.,ROCHE,J.,MICHEL,O. et VARRONE,S.
J.Biol.Chem.,(1963),238,1848

131- MICHEL,R.,LEBLANC,A. et CAYSSALIE,C.
C.R.Soc.Biol.,(1968),162,1717

132- WILSON,D.F. et MERZ,R.D.
Arch.Biochem.Biophys.,(1967),119,470

133- TATA,J.R.,ERNSTER,L. et SURANYI,E.B.
Biochim.Biophys.Acta,(1962),60,461

134- TATA,J.R.,ERNSTER,L. et SURANYI,E.B.
Biochim.Biophys.Acta,(1962),60,480

135- LOFRUMENTO,E.,MEYER,A.J.,TAGER,J.M.,PAPA,S. et QUAGLIARIELLO,E.
Biochim.Biophys.Acta,(1970),197,104

136- KRAAYENHOF,R. et VAN DAM,K.
Biochim.Biophys.Acta,(1969),172,189

137- VAN DAM,K. et SLATER,E.C.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.,(1967),58,2015

138- VELDSEMA-CURRIE et SLATER,E.C.
Biochim.Biophys.Acta,(1968),162,310

139- MICHEL,R.,MICHEL,O. et LEBLANC,A.
C.R.Soc.Biol.,(1967),161,98

140- KEILIN,D. et HARTREE,E.F.
Nature,(1955),176,200

141- ESTABROOK,R.W.
J.Biol.Chem.,(1958),230,735

142- KANIUGA,Z.,BRYLA,J. et SLATER,E.C.
Inhibitors around the antimycin-sensitive site in the respiratory chain.
dans Inhibitors tods in cell research,p.282.
Colloque avril 1969,Ed.Bücher,Th et Sies,H.

143- CHANCE,B.,HOLLUNGER,G. et HAGIHARA,B.
Biochem.Biophys.Res.Commun,(1962),8,180-

144- SLATER,E.C.
Nature,(1953),172,975

145- SLATER,E.C.
Advances in Enzymology,(1958),20,147

146- KING,T.E.
Advances in Enzymology,(1966),28,218

147- BERDEN,J.A. et SLATER,E.C.
Biochim.Biophys.Acta,(1970),216,237

148- KANIUGA,Z. et BRYLA,J.
Post.Biochem.(1966),12,451

149- KLINGENBERG,M.
Angew.Chem.,(1963),75,900

150- CHANCE,B. et HAGIMARA,B.
dans Intracellular respiration
ed.SLATER,E.C.,Pergamon Press,(1963),5,3

151- VAN DAM,K.
Biochim.Biophys.Acta,(1967),131,407

152- WILSON,D.F. et MERZ,R.
Arch.Biochem.Biophys.,(1969),129,79-85

153- HARRIS,E.J.,HOFER,M.P. et PRESSMAN,B.C.
Biochemistry,(1967),6,1348

154- HARRIS,E.J.,VAN DAM,K. et PRESSMAN,B.C.
Nature,(1967),213,1126

155- GAMBLE,J.C.
J.Biol.Chem.,(1965),240,2668

156- TSOU,C.S. et VAN DAM,K.
Biochim.Biophys.Acta,(1969),172,174

157- GUTMAN,M.,MAYR,M.,OLTZIK,R. et SINGER,T.P.
Biochem.Biophys.Res.Commun,(1970),41,40

158- KATYARE,S.S.,FATTERPAKER,P. et SREENIVASAN,A.
Arch.Biochem.Biophys.,(1971),144,209

159- CAPLAN,A.I. et CARAFOLI,E.
Biochim.Biophys.Acta,(1965),104,317

160- SWEETMAN,A.J. et GRIFFITHS,D.E.
Febs Letters,(1970),10,92

161- RUZICKA,F.J. et CRANE,F.L.
Biochem.Biophys.Acta,(1970),223,71

162- KNOOK,D.L. et PLANTA,R.J.
Febs Letters,(1971),14,54

163- ROSSI,E.,NORLING,B.,PERSSON,B. et ERNSTER,L.
Eur.J.Biochem.,(1970),16,508

164- ERNSTER,L.,LEE,I.Y.,NORLING,B. et PERSSON,B.
Febs Letters,(1969),3,21

165- GUTMAN,M.,KEARNEY,E.B. et SINGER,T.P.
Biochem.Biophys.Res.Commun,(1971),42,1016

166- KROGER,A.
dans 19 Colloquim der Gesellschaft für Biologische Chemie
24-27 April 1968 in Mosbach,p.137
Logic in design of the respiratory chain

167- URBAN,P.F. et KLINGENBERG,M.
Eur.J.Biochem.,(1969),9,519

168- MORTON,R.A.
Biochemistry of Quinones,Academic Press,London,(1965),p.4

169- CLARK,W.M.
Oxidation reduction potentials of organic systems
Williams and Williams Co.Baltimore,(1960).

170- MORET,V.,PINAMONTI,S. et FORNASARI,E.
Biochim.Biophys.Acta,(1961),54,381

171- BUTLER,M.N.T.et CHARKEY,L.W.
Proc.Exp.Biol.Med.,(1970),134,625

172- INAMDAR,A.R. et RAMASARMA,T.
Biochem.J.,(1969),111,479

173- HOCH,F.L. et LIMPANN,F.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.,(1954),40,909

174- BRONK,J.R. et BRONK,M.S.
J.Biol.Chem.,(1962),237,897

175- CHANCE,B.et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1961),236,1534

176- SLATER,E.C.
Biochem.J.,(1950),46,484

177- CHANCE,B.
J.Biol.Chem.,(1961),236,1544

178- CHANCE,B. et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1961),236,1555

179- CHANCE,B. et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1961),236,1562

180- CHANCE,B.
J.Biol.Chem.,(1961),236,1569

181- CHANCE,B. et HOLLUNGER,G.
J.Biol.Chem.,(1961),236,1577

182- CHANCE,B. et HOLLUNGER,G.
Nature,(1960),185,666

183- ERNSTER,L.
dans Biological Structure and Function
International Symposium,Vol.2,Academic Press,N.Y.,(1960),p.139

184- RUZICKA,F.J. et CRANE,F.L.
Biochim.Biophys.Acta,(1971),226,221

185- VELDSEMA-CURRIE,R.D. et SLATER,E.C.
Biochim.Biophys.Acta,(1970),197,113

186- SCHACHINGER,L.,EISENHARDT,R.M. et CHANCE,B.
Biochem.Z.,(1960),333,182

187- VAN DAM,K.
Biochim.Biophys.Acta,(1966),128,337

188- MURAOKA,S. et SLATER.E.C.
Biochim.Biophys.Acta,(1969),180,227

189- HELDT,H.W.,QUAGLIARIELLO,E.,PAPA,S.,SLATER,E.C. et TAGER,J.M.
in Mitochondrial Structure and Compartmentation
Adriatica ed.,Bari,(1967),p.260

190- KEMP,A. Jr.,GROOT,G.S.P. et REITSMA,H.J.
Biochim.Biophys.Acta,(1969),180,28

191- CHANCE,B. et WILLIAMS,G.R.,
J.Biol.Chem,(1955),217,395

S O M M A I R E

INTRODUCTION ET OBJET DU TRAVAIL 1

CHAPITRE I - MATERIEL ET TECHNIQUES GENERALES 12

I- Préparation des mitochondries 12

1) Mitochondries hépatiques de rat 12

a) Homogénéisation 13
b) Séparation et lavages 13

2) Mitochondries cardiaques de rat 14

II- Caractérisation biochimique des mitochondries 15

1) Dosage des protéines mitochondriales 15

a) Principe 15
b) Réactifs 15
c) Mode opératoire 15

2) Détermination de la consommation d'oxygène 16

a) Appareillage 16
b) Mesure 17

3) Détermination du contrôle respiratoire et du rapport P/O 17

a) I.R.C. 18
b) P/O 18

4) Mesures de l'état d'oxydoréduction des coenzymes respiratoires 20

a) Méthode cinétique 20

X Principe 20
X Appareillage 23
X Etats respiratoires de CHANCE 23

b) Déterminations chimiques 26

X Dosage du NAD 26

. Principe 26
. Réactifs 27
. Extraction du NAD des mitochondries 27
. Mesures spectrophotométriques 27

X Dosage de l'ubiquinone 28

. Principe 29
. Réactifs 31
. Mode opératoire - Extraction 31
. Mesures spectrophotométriques 31
. Vérification de pureté 32

CHAPITRE II - METABOLISME MITOCHONDRIAL DES IODOTHYRONINES EN RELATION AVEC LEURS EFFETS RESPIRATOIRES SUR LES PARTICULES ISOLEES DE FOIE DE RAT 34

I- Conditions expérimentales 35

1) Mesures de la consommation d'oxygène 35
2) Pénétration 36
3) Métabolisme des iodothyronines 36

II- Résultats 37

1) Consommation d'oxygène 37
2) Pénétration 41
3) Métabolisme 48

III- Discussion et conclusions 52

CHAPITRE III - CINETIQUES D'ACTION DE DIVERS EFFECTEURS RESPIRATOIRES SUR L'ETAT D'OXYDOREDUCTION DES COENZYMES 57

INTRODUCTION 57

I- Conditions expérimentales 57

II- Résultats 58

1) Mitochondries hépatiques de rat 58

a) Inhibiteurs du transfert des électrons 59

X Introduction 59
X Résultats 59
X Discussion 61

b) Action de découplants types 61

X Introduction 61
X Résultats 62
X Discussion 66

c) Action des hormones thyroïdiennes 68

X Introduction 68
X Résultats 68

. Etat 4 68
. Etat 3 70
. Doses croissantes de T4 sur Fp 75
. Doses croissantes de T4 sur NAD 76
. Action de DBP après T4 80

X Discussion 80

d) Cations divalents 82

X Introduction 82
X Résultats 83
X Discussion 87

2) Mitochondries cardiaques de rat 88

Introduction 88

Résultats 88

III- Discussion 91

CHAPITRE IV - ROLE DE L'UBIQUINONE. VARIATIONS DE SON ETAT REDOX 92

I- Introduction 92

II- Résultats 93

TECHNIQUES D'INCUBATION 95

I- Effet de la thyrosine sur la réduction du NAD produite par le succinate de sodium 95

1) Conditions expérimentales 95

2) Résultats 96

3) Discussion 96

II- Variations de l'état d'oxydoréduction du NAD et de l'ubiquinone sous l'effet de la L-thyroxine, après préincubation, à partir du β hydroxybutyrate. 99

1) Cinétique des variations de l'état redox du NAD 99

a) Conditions expérimentales 99

b) Résultats 100

2) Déterminations de l'état redox de l'ubiquinone 100

a) Conditions expérimentales 102

b) Résultats 102

3) Discussion 104

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 105

BIBLIOGRAPHIE 108